

О.Ю. Сметана

# Сільськогосподарська біотехнологія

*Курс лекцій*

Миколаїв  
2017

Автор: О. Ю. Сметана

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 25.05.2017 р., протокол № 9.

Рецензенти:

- І. М. Рожков – д-р біол. наук, професор, академік АН ВО України, професор кафедри біологічних основ фізичної культури та спорту Миколаївського національного університету ім. В. О. Сухомлинського;  
Я. В. Письменний – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри ґрунтознавства та агрохімії Миколаївського національного аграрного університету.

**Сметана О. Ю.**

С50 Сільськогосподарська біотехнологія : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навчання / О. Ю. Сметана. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 132 с.

У курсі лекцій викладено зміст дисципліни «Сільськогосподарська біотехнологія». Зокрема, надано інформацію щодо ефективності використання біологічних добрив і біотехнологічних препаратів у комплексному захисті рослин, культивування клітин і тканин рослин, а також напрямів і перспектив їх генетичної модифікації. Розглянуті біотехнології у ветеринарній медицині, при відтворенні тварин, а також особливостей їх трансгенезу. Представлені дані щодо біотехнологій виробництва кормових білків, незамінних амінокислот, вітамінних і ферментних препаратів, антибіотиків та пробіотиків. Описані найбільш популярні і ефективні способи біоконверсії відходів сільського господарства.

Курс лекцій розрахований на здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія».

**УДК 606:63**

© Миколаївський національний аграрний університет, 2017

© Сметана О. Ю., 2017

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	4
Лекція № 1. Біологічні добрива .....	5
Лекція № 2. Біотехнологічні препарати у комплексному захисті рослин.....	16
Лекція № 3. Культивування рослинних клітин і тканин.....	36
Лекція № 4. Трансгенні рослини.....	43
Лекція № 5. Біотехнологія відтворення тварин .....	60
Лекція № 6. Біотехнологія у ветеринарній медицині .....	70
Лекція № 7. Методи отримання трансгенних тварин.....	81
Лекція № 8. Виробництво кормових білків.....	91
Лекція № 9. Виробництво незамінних амінокислот .....	98
Лекція № 10. Виробництво вітамінних препаратів.....	104
Лекція № 11. Виробництво ферментних препаратів, антибіотиків та пробіотиків.....	110
Лекція № 12. Біотехнологія утилізації відходів тваринництва .....	116
Лекція № 13. Біотехнологія одержання біогазу.....	123
Література .....	130

## ВСТУП

Біотехнологія – це міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук і яка передбачає використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. З розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства – ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і навколишнього середовища.

Біотехнологія у сільському господарстві полегшує традиційні методи селекції рослин і тварин та розробляє нові технології, що дозволяють підвищити ефективність сільського господарства. У багатьох країнах методами генетичної і клітинної інженерії створені високопродуктивні і стійкі до шкідників, хвороб, гербіцидів сорти сільськогосподарських рослин, а також тварини зі зміненою якістю продукції. Розроблена техніка оздоровлення рослин від накопичених інфекцій, що особливо важливо для культур, які розмножуються вегетативно (картопля й ін.). Як одна з найважливіших проблем біотехнології в усьому світі, дослідження можливості керування процесом азотфіксації, зокрема можливість уведення генів азотфіксації у геном корисних рослин, а також процесом фотосинтезу. Досліджується поліпшення амінокислотного складу рослинних білків. Розробляються нові регулятори росту рослин, мікробіологічні засоби захисту рослин від хвороб і шкідників, бактеріальні добрива. Генно-інженерні вакцини, сироватки, моноклональні антитіла використовують для профілактики, діагностики і терапії основних хвороб у тваринництві. У створенні ефективніших технологій племінної справи застосовують генно-інженерний гормон росту, а також техніку трансплантації і мікроманіпуляцій на ембріонах домашніх тварин. Для підвищення продуктивності тварин використовують кормовий білок, вітаміни, антибіотики і пробіотики, отримані мікробіологічним синтезом. Вирішуються проблеми утилізації відходів сільського господарства.

## Лекція № 1. Біологічні добрива

1. *Особливості використання традиційних добрив.*
2. *Загальна характеристика біодобрив.*
3. *Симбіотичні та вільні азотфіксатори.*
4. *Фосфатмобілізуючі мікроорганізми.*
5. *Форми бактеріальних препаратів.*

① *Рослини* – це автотрофні організми, що використовуючи сонячну енергію синтезують усі сполуки свого тіла з вуглекислоти, води і мінеральних речовин ґрунту. Останні є кофакторами ферментів і регулюють реакції обміну речовин у живих організмів. Вирощування культурних рослин і їхня урожайність лінійно залежать від наявності мінеральних речовин в ґрунті.

Для досягнення високої продуктивності сільськогосподарських рослин широко використовується збагачення ґрунтів мінеральним азотом, фосфором, калієм тощо.

Останнім часом основним засобом досягнення високої продуктивності рослинництва стали інтенсивні технології, які передбачають використання різноманітних хімічних препаратів (мінеральних добрив, гербіцидів, пестицидів, регуляторів росту рослин). Це дозволяє ефективно вирішувати проблему забезпечення населення харчуванням. Однак, створює загрозу для довкілля та здоров'я людини.

Серед засобів хімізації аграрного виробництва провідна роль належить мінеральним добривам. Надмірне використання мінеральних добрив викликає:

- підвищення кислотності;
- зниження суми поглинених основ;
- порушення співвідношення різних елементів живлення – калію, кальцію, заліза, магнію;

- підвищується рухливість важких металів (що призводить до збільшення їх кількості в продуктах рослинництва);
- накопичення у ґрунті і продукції рослинництва надлишкової кількості нітратів, які можуть викликати в організмі людини утворення канцерогенних нітрозосполук.

Не можна забувати, що виготовлення мінеральних добрив потребує використання великої кількості енергоресурсів та коштів. Наприклад, для виробництва 1 т аміачної селітри потрібно стільки енергії, скільки її виділяється при спалюванні 5 т вугілля.

У зв'язку з цим не втрачає актуальності пошук альтернативних методів ведення аграрного виробництва. Важлива роль у цьому належить використанню діяльності ґрунтової мікрофлори, адже вона бере безпосередню участь в утворенні гумусу, мінералізації органічних речовин і перетворенні їх у легкодоступні для рослин форми.

Одним із методів цілеспрямованого використання мікробіологічних процесів для покращення умов життя для рослин є застосування бактеріальних добрив.

② У складі *бактеріальних добрив* містяться не окремі елементи для живлення рослин, а бактеріальні культури (комбінації бактеріальних культур), завдяки діяльності яких досягається поліпшення поживного режиму рослин.

Найпоширенішими сьогодні є азотфіксуючі і фосфатмобілізуєчі бактеріальні добрива. В Україні бактеріальні добрива виготовляють Інститут сільськогосподарської мікробіології та АПВ НААН, Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології та АПВ НААН, Інститут агроєкології та природокористування НААН, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України.

Процес виробництва біодобрив на основі активного штаму бактерій складається з таких основних стадій:

- зберігання посівного матеріалу на середовищі, що сприяє збереженню корисних властивостей мікроорганізму (наприклад, високої нітрогеназної активності). Найчастіше, це безазотні або бідні на азот поживні середовища, наприклад картопляний агар;
- реактивація культури бактерій після тривалого зберігання подвійним, а за необхідності і потрійним пасируванням;
- одержання інокуляційної культури;
- підготовка стерильного поживного субстрату;
- інокуляція субстрату та інкубація мікроорганізму в ньому;
- визначення якості одержаного препарату: титр клітин бактерій в 1 г, вологість і наявність сторонніх мікроорганізмів.

Препаративна форма кожного штаму потребує певних індивідуальних технологічних підходів.

③ *Фіксація молекулярного азоту* – один з ключових процесів, що визначає біологічну продуктивність нашої планети. Азот входить до складу білків та інших важливих для всіх живих організмів речовин. Людина і тварини отримують азот з білків тваринного і рослинного походження. Рослини як джерело азоту використовують солі азотної кислоти та іони амонію.

Фіксація молекулярного азоту з повітря біологічним шляхом є процесом зв'язування і засвоєння азоту мікроорганізмами. Він має важливе практичне значення, оскільки промислове виробництво хімічних азотних добрив потребує значних затрат енергоресурсів і є небезпечним з екологічної точки зору. Створення і використання біопрепаратів на основі азотфіксуючих мікроорганізмів – найефективніший спосіб підвищення продуктивності рослин та якості урожаю, що дозволяє зберегти природну родючість ґрунту та екологічну рівновагу довкілля.

*Діазотрофи* – мікроорганізми, що здатні до фіксації молекулярного азоту, прийнято поділяти на дві групи: симбіотичні азотфіксатори та вільноіснуючі. Симбіотичні азотфіксатори представлені родами бактерій *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*. Вони здатні зв'язувати молекулярний азот лише у симбіозі з вищими рослинами (бобовими). При цьому вони мають більший потенціал, ніж вільноіснуючі, які доволно живуть у ґрунті й представлені родами бактерій *Clostridium*, *Azotobacter*, *Bejerinckia*, азотфіксуючими фототрофними бактеріями та ціанобактеріями.

Останнім часом увагу вчених все більше привертає здатність фіксувати молекулярний азот мікроорганізмами, що селяться на корінні небобових рослин або в безпосередній близькості від нього. Цю мікрофлору віднесли до групи вільноіснуючих і назвали асоціативною. Перші дослідження в цьому напрямку розпочались з 1975 р. З поверхні коріння деяких тропічних трав були виділені азотфіксуючі мікроорганізми, у складі яких переважали бактерії роду *Azospirillum*. Також до асоціативних азотфіксаторів належать роди бактерій *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*. Обсяги фіксації азоту такою мікрофлорою досить суттєві. Так, у дерново-підзолистому ґрунті під сільськогосподарськими культурами її продуктивність складає 30-40 кг азоту на гектар за рік. Треба відзначити, що сприятлива для рослин дія асоціативних азотфіксаторів пояснюється також виділенням останніми у прикореневу зону своїх метаболітів – вітамінів, ростових речовин, амінокислот тощо.

④ Одним з ключових елементів, що визначає продуктивність сільськогосподарських рослин є фосфор. Рослини здатні засвоювати цей елемент у вигляді вищого оксиду  $PO_4^{-3}$ . У подальшому цей елемент без змін включається до складу органічних сполук.



В Україні майже повністю відсутня сировина для виготовлення мінеральних фосфорних добрив, крім того мінеральні фосфорні добрива лише на 20-25 % використовуються рослинами.

У ґрунті міститься досить велика кількість фосфору (0,1-1 мг/л водного розчину). Дві третини фосфору в ґрунті міститься у вигляді солей ортофосфорної кислоти, третина – це органічні сполуки фосфору (органічні рештки, гумус, фітат, на який припадає половина органічного фосфору у ґрунті). Більша частина сполук фосфору є малорозчинними. Це, за наявності значної кількості фосфору в ґрунті, обмежує можливості використання його рослинами.

Фосфор органічних залишків і гумусу мінералізуються ґрунтовими мікроорганізмами і більша його частина перетворюється в малорозчинні солі. Рослини отримують із них фосфор завдяки виділенню коренями органічних кислот, які хелатують двовалентні катіони і підкисляють ризосферу, сприяючи переходу  $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ . Деякі сільськогосподарські культури добре засвоюють важкорозчинні фосфати (люпин, гречка, горох). Ця здатність у рослин збільшується з віком.

Фосфатмобілізуючі бактерії здатні переводити в доступну рослинам форму трикальційфосфат, дикальційфосфат, гідроксиapatит, кам'яний фосфат. Фосфатмобілізацію можуть проводити бактерії таких родів: *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* тощо. Здатність перетворювати фосфати ґрунту в засвоювану рослинами форму мають також гриби *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria* та деякі актиноміцети і дріжджі.

На процеси фосфатмобілізації в ґрунті впливають різноманітні фактори (джерело вуглецю та азоту, аерація, температура, засоленість ґрунту та ін.). Тому необхідним є вивчення їх дії оскільки вони можуть впливати на ріст мікроорганізмів та на процес розчинення ними фосфатів. Такий підхід дозволить

покращити живлення рослин, активізувати їх ріст і розвиток, значно підвищити урожайність.

У процесі життєдіяльності бактерії можуть використовувати декілька механізмів трансформації фосфору. Розчинення мінеральних фосфатів в результаті синтезу органічних кислот використовують більшість ґрунтових бактерій. Насамперед, бактерії можуть продукувати глюконову (штами *Pseudomonas sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia cepacia*); 2-кетоглюконову (штами *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Bacillus firmus*) кислоти. Бактерії роду *Bacillus* синтезують суміш молочної, ізовалеріанової, ізобутилової та оцтової кислот. Окремі представники ґрунтової мікрофлори утворюють гліколеву, щавелевооцтову, малонову та сукцинілову кислоти.

Іншим механізмом фосфатмобілізації є ферментативне дефосфорилування органічних сполук фосфору при участі ферментів – фосфатаз. Окремі мікроорганізми здатні виділяти сірководень, азотну, карбонову та інші неорганічні кислоти. Так, нітрифікуючі бактерії, окисляючи амоній, утворюють азотну кислоту; сіркобактерії, окисляючи сірководень і сірку, утворюють сірчану кислоту, а інші мікроорганізми в процесах дихання виділяють вуглекислий газ, що переходить у вуглекислоту. Всі ці кислоти взаємодіють із  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  і утворюють дифосфат і монофосфат кальцію, доступні рослинам.

Поряд з мікроорганізмами, здатними самотійно функціонувати в ґрунті, мобілізація фосфору із нерозчинних фосфатів може здійснюватись також облігатними (обов'язковими) симбіонтами – ендомікоризними грибами, здатними утворювати з кореневою системою вищих рослин везикулярно-арбускулярну мікоризу (ВАМ). На сьогодні нагромаджено великий експериментальний матеріал, який свідчить про істотний вплив везикулярно-арбускулярної мікоризи на ріст і розвиток рослин. Встановлено, що ендомікориза відіграє важливу роль у постачанні рослинам поживних речовин, у тому числі і фосфору, зменшує чисельність патогенних мікроорганізмів у ґрунті.

Крім того, вона збільшує обсяги симбіотично засвоєного азоту, у зв'язку з чим виникає необхідність забезпечення ефективного розвитку мікоризи рослин, хоча до цього часу ще не розроблена методика вирощування ендомікоризних грибів у чистій культурі з метою інокуляції цими грибами культурних рослин.

Основні труднощі, які виникають при створенні біопрепаратів на основі ВАР, – це пошук наповнювача-субстрату для культивування гриба. Німецькі дослідники для тривалого збереження інокулюму ВАР використовують пористу глинисту масу, на якій цей інокулюм зберігається протягом п'яти років і не втрачає активності.

Застосування ВАР-грибів має великі перспективи в садівництві та овочівництві, особливо в закритому ґрунті. Цілком логічним є їх застосування і при рекультивації земель, особливо з огляду на важливість заходу з екологічних міркувань.

⑤ За препаративними формами бактеріальні добрива поділяють на рідкі, напіврідкі (суспензійні препарати, препарати зі згущувачами – гельна форма препаратів), сипучі та гранульовані препарати.

Рідкі препарати містять культуральну рідину (бактерії та їх метаболіти, залишки компонентів середовища). Вміст життєздатних бактерій у препаратах досягає від 7 до 10 млрд клітин в 1 мл. Вони зручні у застосуванні, особливо при механізованій обробці насіння. Такі препарати є найпоширенішими в Україні. Значним недоліком яких є обмежена тривалість зберігання (14-20 діб), що обумовлено швидким зниженням кількості життєздатних клітин корисних бактерій. Одним із факторів, що сприяють цьому процесу, є взаємодія клітин з молекулярним киснем.

Малопоширеною, але перспективною може бути гельна форма препаратів бульбочкових бактерій, у якій культура бактерій захищена від несприятливих умов середовища поліцукридним гелем власного чи стороннього походження.

Поліцукриди синтезуються багатьма видами ґрунтових мікроорганізмів, наприклад, різними ризобіями. Бактеріальні екзополіцукриди широко використовують у харчовій, текстильній промисловості. У мікробіологічній промисловості їх використовують для іммобілізації мікроорганізмів, що й ініціювало спроби зробити субстрат на їхній основі.

Спочатку при виготовленні субстратів для гельних препаративних форм використовували нативні екзополіцукриди, тобто ті, що продукуються самим штамом діазотрофу, і виконують захисну функцію, але потім впевнились у необхідності додавання мінерального гелю.

Для порівняння, після зберігання рідкого препарату протягом 3 міс. чисельність життєздатних клітин у ньому знижувалась у 37 разів, а в гельному препараті за таких умов – у 2,2 рази. Це засвідчує перспективність використання гельної форми мікробних препаратів у рослинництві.

У світовій практиці найбільш розповсюджені тверді (сипучі) форми препаратів бактерій на основі органічних та мінеральних субстратів із великою адсорбуючою поверхнею (торф, перліт, вермикуліт, лігнін, каолін та ін.). У таких препаратах бульбочкові бактерії залишаються життєздатними 6-12 місяців. Недоліком є додаткові технологічні операції та висока вартість стерилізації субстрату-носія.

У літературі є багато даних як позитивних, так і негативних про кожен з них, що пояснюється різними властивостями штамів мікроорганізмів та їхніми вимогами до наповнювачів. Придатність сорбуючої речовини для використання як наповнювача визначається біопробою. Для цього можна використовувати два найвибагливіші до субстрату штами: бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* М-8 та асоціативного діазотрофу *Alcaligenes paradoxus* 060207.

Торф і лігнін (останній – у вигляді відходу гідролізного виробництва) виявились доволі вдалим наповнювачами поживного субстрату для розвитку мікроорганізмів, завдяки високій вологоємності, великій сорбуючій поверхні і

невеликим кількостям різних поживних речовин. Встановлено, що у середовищі, виготовленому на лігніновій витяжці, найкраще розвиваються виробничі штами азотфіксуючих бактерій, навіть порівняно з традиційним рідким середовищем.

У торфі та лігніні, завдяки високій кислотності, добре, на відміну від багатьох інших бактерій, розвиваються мікроміцети, які утворюють стійкі спори і часто низька теплопровідність цих наповнювачів не дає змоги якісно їх термостерилізувати. Крім того, у цих наповнювачах за тривалої або повторної термічної стерилізації утворюються токсичні для мікроорганізмів сполуки, тому для їхньої стерилізації використовують дуже енерговитратне жорстке  $\gamma$  проміння.

В Україні взагалі відсутнє виробництво  $\gamma$ -стерильного субстрату для культивування агрономічно цінних мікроорганізмів, тому й звернули увагу на біологічно і хімічно нейтральний вермікуліт.

Вермікуліт случений – це мінерал класу алюмосилікатів, що було піддано високотемпературній обробці для надання йому гігроскопічності. Він має велику сорбуючу поверхню і вологоємність, його можна піддавати багаторазовій термічній стерилізації – токсичних сполук не утворює. Біопрепарати, що виготовлено на вермікулітному субстраті, у більшості не поступаються за якістю торф'яним і лігніновим.

З метою створення ефективних препаратів на основі вермікуліту запропоновано вносити відповідні штами бактерій у стерильний носій, зволожений живильним середовищем. У цій масі вони розмножуються при кімнатній температурі, досягаючи чисельності  $10^8$ - $10^9$  кл./г. Таким чином можна виготовляти препарати бульбочкових бактерій, псевдомонад і бацил. Ці препарати характеризуються стабільністю за тривалого зберігання.

Але поряд з позитивними якостями у препаратів на твердих носіях є недоліки. Їхня нерозчинність ускладнює механізацію процесу обробки насіння, а для утримання часток препарату на поверхні насіння слід застосовувати клейкі

речовини. Це спонукало до пошуку шляхів одержання нових, більш технологічних і економічних у виготовленні і застосуванні, препаративних форм штамів.

Одними із найперспективніших є гранульовані препарати, що виготовляються на основі глинистих мінералів, низки пористих і дисперсних, а також деяких органічних матеріалів.

Більшість штамів, що використовуються у складі бактеріальних добрив, може тривало зберігати життєздатність лише на твердих носіях, але деякі штами можуть існувати в активному стані у рідкій культурі. Наприклад, штам *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 доволі технологічний, тобто легко адаптується у будь-якому виробничому середовищі, але набуває максимального титру – 24,7 млрд кл./мл в середовищі, з якого вилучено амонійний азот і удвічі зменшено концентрацію органічних азотвмісних речовин, що сприяє утворенню великої кількості екзополіцукридів.

В оптимізованому середовищі ентеробактерії штаму 32-3 зберігають життєздатність впродовж 6 місяців з повільним зниженням титру бактерій до 6,6 млрд/мл, що є вищим за субстрат на твердому наповнювачі, тобто не потребує розробки іншої препаративної форми.

Для виготовлення мікробних препаратів використовують також багато інших матеріалів: різні типи вермікомпостів, одержаних з використанням рослинних решток, гною, відходів кавового виробництва; сульфат кальцію; поліакриламідний гель; альгінат; бентоніт тощо.

#### **Питання для контролю:**

1. Яка необхідність використання добрив в агротехнологіях? Наведіть недоліки мінеральних добрив.
2. Назвіть основні етапи виробництва бактеріальних добрив. Охарактеризуйте їх.

3. Наведіть загальну характеристику азотфіксуючих препаратів на основі симбіотичних та вільноіснуючих бактерій.
4. Яка роль бактерій та грибів у живленні рослин фосфором?
5. Які механізми трансформації фосфоровмісних сполук мікроорганізмами Ви знаєте?
6. Особливості мобілізації фосфору ендомікоризними грибами.
7. Охарактеризуйте рідкі і напіврідкі форми бактеріальних добрив.
8. Які наповнювачі використовують при виробництві твердих бактеріальних добрив? Їх переваги та недоліки.

## Лекція № 2. Біотехнологічні препарати у комплексному захисті рослин

1. Шкідники і збудники захворювань рослин.
2. Поняття та класифікація пестицидів.
3. Біоконтроль патогенних мікроорганізмів та комах-шкідників.
4. Вірусні препарати у захисті рослин.
5. Препарати для захисту рослин на основі бактерій.
6. Мікроміцети у захисті рослин.
7. Безпечність мікробіологічних препаратів захисту рослин.
8. Препаративні форми біопестицидів.

① Вплив хвороб рослин на економіку країн значний. Нині відомо близько 200 тис. видів рослин, з них близько тисячі – сільськогосподарських. При цьому основний об'єм рослинної продукції припадає на 15 видів: рис, пшениця, жито, кукурудза, ячмінь, сорго, тростина, картопля, батат, касава (маніок), квасоля, арахіс, соя, кокосова пальма і банан. Серед збудників хвороб і шкідників рослин більше 600 видів вірусів і віроїдів, 250 видів мікоплазм, бактерій, актиноміцетів, 20 тис. видів грибів, 7,5 тис. видів комах, 1000 видів нематод. Лише на картоплі паразитує 300 видів збудників хвороб і шкідників.

Під *хворобою рослини* розуміють порушення нормального обміну речовин під впливом фітопатогенів (віруси, бактерії, гриби) або несприятливих умов середовища. Виходячи з причин виникнення, хвороби прийнято розділяти на: *інфекційні* – спричинені живими патогенними організмами, та *неінфекційні* – викликані абіотичними факторами.

До групи неінфекційних належать хвороби спричинені порушенням живлення (азотного, фосфорного, калійного), наявністю шкідливих речовин в повітрі, воді, ґрунті, порушенням температурного, водного, світлового режиму.



Неінфекційні хвороби ослаблюють рослини і знижують їх стійкість до збудників інфекцій.

Залежно від ступеню ураження рослини розрізняють місцеві (або локальні) ураження та загальні (або дифузні) хвороби, що уражують всю рослину. Неінфекційні хвороби бувають загальними, інфекційні – як загальними, так і локальними.

Розрізняють декілька типів хвороб, викликаних фітопатогенами:

- *В'янення* – ураження провідної та кореневої системи. Збудник локалізується в судинах і спричинює їх механічну закупорку, а також виділяє токсини і ферменти, що пригнічують рослину;
- *Гнилі* – розм'якшення і руйнування тканин рослини під впливом ферментів патогену;
- *Плямистості, або некрози* – відмирання частіше листової пластинки в місцях проникнення патогену. Уражені ділянки чітко відокремлені від неураженої тканини;
- *Пустули* – випуклі спороношення патогену, вкриті епідермісом або перидермою;
- *Муміфікації* – затвердіння та почорніння ураженого органу;
- *Кустистість* – надмірне розростання органів рослини;
- *Скручування, курчавість, зморшкуватість, нитковидність листя* – утворення наростів і деформацій.

Походження паразитарних форм, до яких належать і фітопатогени, розглядають як результат зміни сапротрофного типу живлення. На поверхні уражених органів рослин розвиваються *екзопаразити*, всередині живуть *ендопаразити*.

Фітопатогени за ступенем паразитизму поділяють на облігатні та факультативні. *Облігатні* паразити живуть лише в рослинах-господарях та гинуть

у разі загибелі рослини. *Факультативні* паразити здатні жити як в живій рослині, так і вести сапрофітний спосіб життя.

Фітопатогенні організми можуть розповсюджуватися з потоком повітря, водою, пилом, насінням, рослинними залишками, комахами, тваринами, транспортними засобами.

Шляхи проникнення фітопатогенів в рослини різні. У більшості випадків вони проникають через пошкоджену поверхню, структурні отвори, рідко через інтактну поверхню рослини. Рани виникають під впливом фізичних (коливання температури), механічних, біологічних (тварини, комахи) факторів. Здатність фітопатогенів проникати в рослину через пошкоджену поверхню залежить не лише від їхніх біологічних властивостей, а й від ступеню стійкості рослини, швидкості утворення коркового шару, складу його активних компонентів, активності низки окислювальних ферментів. Проникнення через пошкоджену поверхню типове для бактеріальних та вірусних фітопатогенів. Ураження через природні отвори – типове для грибних патогенів.

Інфекційні хвороби є результатом складної взаємодії збудника з рослиною-господарем. Характер цієї взаємодії залежить від наявності наступних умов:

- чутливої до певного патогену рослини-господаря;
- достатньої кількості інфекційного матеріалу;
- контакту рослини-господаря та патогену при відповідних умовах зовнішнього середовища.

Якщо хоча б одна з цих умов не дотримується, розвиток хвороби не відбувається.

② На підставі Державного реєстру пестицидів і агрохімікатів Міністерство екології та природних ресурсів України розробляє, погоджує з Міністерством охорони здоров'я та Мінагрополітики, готує до друку та видає один раз на п'ять років Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні,

з щорічним виданням доповнень до нього про нові зареєстровані, а також заборонені до використання препарати.

Хімічні речовини, що використовуються для боротьби зі шкідниками та збудниками захворювань, мають загальну назву *пестициди*. Їх класифікують за об'єктами, проти яких вони застосовуються, за способом надходження до організму, характеру дії на шкідливі організми, хімічному складу. У залежності від об'єкту і напрямку використання пестициди підрозділяють на:

- акарициди – для боротьби з кліщами;
- інсектициди – для боротьби з комахами;
- молюскоциди – для боротьби з моллюсками і слизовиками;
- нематициди – для боротьби з нематодами;
- родентициди – для боротьби з гризунами;
- фунгіциди – для боротьби з збудниками грибних хвороб рослин;
- бактерициди – для захисту від бактеріальних хвороб;
- гербіциди – для боротьби з бур'янами;
- альгіциди – для боротьби з водоростями;
- дефоліанти – препарати для видалення листя;
- десиканти – препарати для підсушування рослин.

Препарати перших трьох груп підрозділяють в залежності від фази розвитку шкідливого організму, на якій застосовують препарат: *овіциди* – для знищення яєць, *ларвіциди* – для знищення личинок, *імагоциди* – для знищення дорослих комах.

За способом проникнення в організм шкідника розрізняють: *препарати контактної дії*, які проникають через покриви тіла; *препарати кишкової дії*, які виявляють токсичну дію при проковтуванні, *фумігати*, які потрапляють через органи дихання.

За гігієнічною класифікацією пестициди прийнято поділяти на чотири групи: сильнодіючі отруйні речовини із середньолетальною дозою (LD<sub>50</sub>) до 1 мг/кг

маси тіла, високотоксичні – LD<sub>50</sub> від 50 до 200 мг/кг, середньотоксичні – LD<sub>50</sub> від 200 до 1000 мг/кг, малотоксичні – LD<sub>50</sub> більше 1000 мг/кг).

Для охорони здоров'я населення і попередження циркуляції пестицидів у природі встановлені гігієнічні нормативи гранично допустимих концентрацій (ГДК) пестицидів у повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, у воді відкритих водоймищ і в ґрунті, а також гранично допустимі залишкові кількості (ДЗК) пестицидів у різних харчових і кормових продуктах та допустимі строки останніх обробок культур до збирання урожаю (час очікування) – період, протягом якого застосований пестицид руйнується цілком або до допустимих залишкових кількостей. Перевищення цих нормативів неприпустиме.

При застосуванні пестицидів виникають наступні екологічні проблеми:

- 1) Поява нових шкідників.
- 2) Розвиток резистентності.
- 3) Поява в харчових продуктах залишків пестицидів.
- 4) Знищення дикої фауни і флори.

Отже, застосування хімічних засобів призводить до цілого ряду негативних наслідків, але відмовитись від їх використання в теперішній час просто неможливо, оскільки воно є складовою частиною сучасних технологій вирощування сільськогосподарських культур.

③ Глибокі знання біологічних особливостей основних живих компонентів конкретних біоценозів та закономірностей їх функціонування є основою оптимального регулювання складу та чисельності окремих видів з урахуванням багатоцільових потреб людини, зокрема економічних, природоохоронних, санітарно-гігієнічних та інших.

Біологічний захист рослин є прикладною галуззю знань, що бурхливо розвивається. Він ґрунтується на тому, що зниження чисельності будь-якого небажаного для людини виду мікроорганізму, рослини чи тварини можна

здійснити за використання його паразитів та антагоністів. Ентомопатогенні організми належать до різних груп вірусів, бактерій, грибів, найпростіших, нематод. На їх основі створені препарати, які широко застосовують в захисті рослин, що сприяє отриманню екологічно чистої продукції.

З позицій сьогоднішніх потреб суспільства біологічний метод захисту рослин ставить перед собою такі завдання:

- вивчення природних ресурсів корисних організмів і продуктів їх життєдіяльності для використання у захисті рослин;
- виявлення закономірностей у взаємовідносинах популяції фітофагів з регулюючими їх чисельність паразитичними і хижими організмами з метою прогнозу рівня шкодочинності збудників хвороб, шкідників і бур'янів;
- на основі глибоких біоценологічних та екологічних досліджень розробити прийоми, що активізують природні комплекси корисних організмів;
- створити широкий асортимент активних біологічних препаратів, що регулюють ріст, розвиток і поведінку фітофагів, а також розробити технології масового одержання та розселення паразитичних і хижих безхребетних.

Основні прийоми і методи біологічного захисту:

- використання паразитичних і хижих комах (ентомофагів);
- мікробіологічний метод (використання патогенних мікроорганізмів, які вражають шкідливі для сільського господарства організми);
- селекційно-генетичний метод (культивування створених генетиками-селекціонерами стійких до пошкодження шкідниками сортів сільськогосподарських культур);
- біотехнічний метод (регуляція поведінки комах та порушення процесів їх росту і розвитку);
- генетичні, або автоцидні, методи захисту рослин (введення в популяцію шкідника нежиттєздатних або безплідних особин, переважання в популяції самців, моновольтинізм для шкідників, що розвиваються у двох і більше

поколіннях, і, навпаки, використання цитоплазматичної несумісності, отримання бездіапаузних популяцій та ін.);

- методи молекулярної біології та генної інженерії (отримання генетично модифікованих (трансгенних) рослин, стійких до шкідливих організмів, гербіцидів);
- біологічна боротьба з бур'янами (використання комах-фітофагів для боротьби з бур'янами).

Необхідно зазначити, що в нинішніх умовах застосування лише біологічного методу не дає змоги повною мірою захистити сільськогосподарські культури від шкідників та збудників хвороб. Тут відіграють певну роль матеріально-технічні труднощі в реалізації біометоду і безпідставний скепсис щодо його ефективності. Сьогодні лише інтегрований захист рослин, який є ідеальною комбінацією біологічних, агротехнічних, селекційно-генетичних, хімічних та інших методів, спрямованих проти комплексу шкідників та хвороб у конкретній еколого-географічній зоні на певній культурі, і при якому здійснюється регулювання чисельності шкідливих видів до економічного порогу шкодочинності і збереження дії природних корисних організмів, ставить надійний заслін перед шкідниками та хворобами сільськогосподарських культур.

Оскільки пестициди, що використовуються для захисту рослин, мають значний негативний вплив на довкілля, виникає необхідність зменшення їхнього застосування. Вирішенням цієї проблеми може бути застосування в системі інтегрованого захисту рослин біотехнологічних препаратів на основі мікроорганізмів – антагоністів збудників хвороб рослин чи збудників хвороб шкідників рослин.

Застосування біотехнологічних препаратів для захисту рослин ґрунтується на використанні природних закономірних взаємовідносин між патогенними організмами і сприйнятливими до них макроорганізмами, що забезпечує специфічну вибірковість методу. Біологічні агенти, що є основою таких

препаратів, спричиняють епізоотії в популяціях шкідників, зменшуючи їх чисельність до економічно безпечного рівня і при цьому не завдають шкоди іншим видам тварин і рослин. Біопрепарати відносно безпечні для біосфери, оскільки не є чужорідними, а взяті з самої природи.

Для раціонального і економічно доцільного використання біологічних засобів захисту рослин від шкідників та хвороб застосовують оригінальну в кожному випадку тактику. Застосування біопрепаратів за аналогією з хімічними пестицидами збіднює і знижує можливості біологічної боротьби зі шкідливими організмами. Біопрепарати діють значно повільніше, ніж хімічні пестициди. Так, наприклад, головною та істотною особливістю мікробних інсектицидів є вплив на активність харчування шкідника. А особливістю дії мікробного родентициду є виникнення епізоотії серед гризунів. Вимирання шкідників відбувається більш тривало.

Світовий збут біопестицидів становить 0,5% усього обсягу світового ринку агрохімії. Щороку реалізація біопестицидів зростає на 10-20%.

Найрозповсюдженішими біопрепаратами є: інсектициди на основі кристалоутворюючої бацили *Bacillus thuringiensis*; бактородентицид на основі *Salmonella enteritidis var. Isatschenko*, що призводить до епізоотій окремих видів мишоподібних гризунів; інсектицид на основі гриба *Beauveria bassiana*; фунгіцид на основі гриба *Trichoderma lignorum*.

④ Вірусні препарати для захисту рослин в основному мають інсектицидну дію. Віруси, які розмножуються у клітинах комах і мають у своєму складі ДНК, належать до родин бакуловірусів (*Baculoviridae*), вірусів віспи (*Poxiviridae*), іридовірусів (*Iridoviridae*) і парвовірусів (*Parvoviridae*), які мають РНК – пікорнавірусів (*Picornaviridae*) і реовірусів (*Reoviridae*).

Вірусні препарати для захисту рослин виробляють в основному на основі бакуловірусів, а саме вірусів ядерного поліедрозу і вірусів гранульозу. Дія вірусів

високоспецифічна і спрямована на комах певних видів. Вірусні препарати не шкідливі для довкілля і не порушують усталені біоценотичні зв'язки. Ентомопатогенні віруси безпечні для людини, сільськогосподарських тварин, корисних комах. Однак для більш широкого використання вірусних препаратів в сільському господарстві існує низка перепон. Однією з головних причин обмеженого використання вірусів є висока вартість вірусних препаратів, а також тривалий латентний період розвитку вірусної інфекції. Латентний період між початком інфекції і загибеллю шкідника визначається тривалістю процесу проникнення вірусу в організм господаря і наступного накопичення вірусних частинок. Зазвичай латентний період розвитку бакуловірусної інфекції 7-10 діб, за цей час шкідник може завдати значної шкоди рослинам і урожаю.

Вірусні препарати як правило спрямовані на захист рослин від комах-шкідників. Такі препарати прийнято називати *віринами*. Крім слова «вірин» до назви препарату включають індекс, що позначає назву вірусу та комахи-господаря. Наприклад, препарат «вірин-ГЯП» – створено на основі вірусу гранульозу яблуневої плодожерки, препарат «вірин-АБМ» («вірин-АББ») – містить віруси гранульозу та поліедрозу американського білого метелика (бабочки).

Віруси здатні до розмноження лише у живих організмах, чим і визначаються способи їхнього масового розмноження при виробництві вірусних препаратів. Для отримання великої кількості вірусних часток (які згодом стануть основою біологічного препарату) використовується два підходи:

- 1) вирощування в лабораторіях господаря вірусу, зараження його та отримання очищеного інфекційного матеріалу;
- 2) культивування в лабораторних умовах окремих клітин, чутливих до вірусу, їх зараження вірусом і отримання очищеного інфекційного матеріалу.



⑤ Бактерії, патогенні для комах, належать до трьох родин: *Pseudomonas*, *Enterobacter* та *Bacillus*. Серед бактеріальних препаратів для захисту рослин найбільш поширеними є препарати на основі *Bacillus thuringiensis*, які використовуються у захисті рослин з 1928 року. Досить розповсюдженими є також фунгіциди на основі бактерій. Це препарати, які містять живі клітини *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureofaciens* або інших видів бактерій. Бактеріальні препарати також використовують для боротьби з мишоподібними гризунами. Найвідоміший на території України препарат такого напрямку – Бактеродентицид, який містить живі клітини *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko*.

Серед представників роду *Pseudomonas* є антагоністи фітопатогенів та ентомопатогенні форми. Бактерії роду *Pseudomonas* часто виявляють у здорових та загинувших комах.

*Pseudomonas fluorescens* описано як збудника септицемії совки озимої, мухи шведської в асоціації з іншими потенційно патогенними бактеріями.

*Pseudomonas carnea* – потенційний збудник хвороб комах. Викликає септицемію у комах. Господар – капустяний білан, бавовняна совка, воскова міль, таргани.

*Serratia marcescens* – факультативний паразит, утворює характерний червоний пігмент, за що отримала назву «паличка чудесної крові». Уражує твердокрилих, лускокрилих, двокрилих, прямокрилих, перетинчастокрилих, кліщів.

*Clostridium malacosomae* – збудник бактеріозу кільчастого шовкопряда. Бактерії розмножуються у кишечнику господаря, викликаючи його параліч, не проникають у порожнину тіла. Після смерті тіло комах висихає і муміфікується.

*Bacillus popilliae* – облигатний паразит, утворює ендотоксини. У разі проникнення збудника розвиток відбувається в порожнині тіла комах впродовж тривалого періоду. Тіло хворих комах заповнюється спорами і вони

гинуть, як правило в період метаморфозу. Уражує личинок японського жука, майського, червненого хрущів та інших пластинчатовусих.

*Bacillus cereus* – поширена в ґрунті, тілі комах, продуктах. Патогенна для комах, особливо лускокрилих. Істотну роль в патогенній дії відіграє продукування протеолітичних ферментів. Штучне зараження комах частіше не дає позитивних результатів. Вважають, що для розвитку хвороби необхідні певні фактори навколишнього середовища, що впливають на організм комах.

*Bacillus thuringiensis* – збудник септицемій комах. Факультативний паразит. Зустрічається переважно у лускокрилих. У хворих комах спостерігається виділення з ротового і анального отворів рідини бурого кольору з різким гнилою запахом. Сприйнятливими є білани, молі, п'ядуни, коконопряди, листокрутки тощо.

Механізм інсектицидної дії *B. thuringiensis* пов'язаний з утворенням цими бактеріями білкового параспорового кристалу. Цей кристал утворюється під час споруляції бактерій. На його долю припадає від 20 до 30 % сухої маси культури *B. thuringiensis*. Складається кристал в основному з білку (близько 95%) та вуглеводів (до 5%).

Білковий кристал, який утворюється безпосередньо в клітинах *B. thuringiensis* не має інсектицидної активності. Після проковтування кристалу комахою в її кишечнику в слабко лужних умовах він розпадається на субодиниці (протоксин), які під дією специфічних протеїназ перетворюються на активний токсин. Активний токсин вбудовується в мембрану епітеліальних клітин кишечника комах і утворює іонний канал, через який відбувається втрата значної кількості клітинної АТФ. Через 15 хвилин після утворення іонного каналу клітинний метаболізм блокується, комаха перестає харчуватися, відбувається зневоднення організму та його загибель. Оскільки перетворення прототоксину в активну форму відбувається лише за дії специфічних протеїназ, токсини *B. thuringiensis* є безпечними для людини та сільськогосподарських тварин.

Препарати на основі цих бактерій можуть містити спори бактерій і кристали ендотоксину або спори, кристали ендотоксину та термостабільний екзотоксин. У деяких країнах виробляють інсектицидні препарати, які містять очищений ендотоксин *B. thuringiensis*. Випускають препарати на основі *B. thuringiensis* у вигляді сухих порошоків. Як наповнювачі використовують каолін та інші матеріали, що використовують при створенні хімічних інсектицидів. Препаративні форми містять від 30 до 100 млрд. спор та кристалів в 1 г. Використовують бактеріальні препарати у вигляді суспензій, а розповсюджують за допомогою наземної та авіаційної апаратури.

Інсектицидні препарати на основі *B. thuringiensis* також використовують для боротьби з листогризучими комахами овочевих та садових культур, паркових та лісових насаджень, лікарських рослин.

В Україні препарати для захисту рослин від комах-шкідників на основі бактерій виробляються лише із застосуванням штамів *Bacillus thuringiensis*.

Частка біоінсектицидів на основі *B. thuringiensis* становить близько 1% світового ринку інсектицидів. Однак за прогнозами ця цифра буде збільшуватися і подальший прогрес в галузі використання інсектицидів пов'язують саме з біоінсектицидами.

Мишоподібні гризуни, окрім шкоди сільському господарству, є джерелом важких інфекційних та інвазійних хвороб людини та сільськогосподарських тварин. Тому заходам зі знищення цих шкідників приділяють велику увагу.

Методи знищення мишоподібних гризунів поділяють на механічні, хімічні та біологічні. Останні включають використання природних ворогів: домашніх тварин (коти, собаки), хижих ссавців (лиси, ласки, горностаї), птахів (сови, сороки, сіра ворона) та збудників хвороб гризунів.

Біотехнологічні препарати у боротьбі з гризунами почали використовувати ще наприкінці XIX ст. Метод базується на зараженні гризунів специфічними патогенами, які належать до роду *Salmonella* і спричиняють епізоотії.

Фундаторами такого методу боротьби із гризунами є І.І. Мечников, Н.Ф. Гамалея та Л.Пастер.

Штам, який використовують на території України для створення препаратів для боротьби із гризунами, було ізольовано у 1897 році Б.Л.Ісаченко під час епізоотії серед сірих пацюків. За морфолого-культуральними, серологічними, біохімічними та патогенними властивостями він належить до виду *Salmonella enteritidis*. Для збереження біологічних властивостей цих бактерії С.С.Мережковський запропонував оригінальне поживне середовище – 10% відвар курячого білка на воді.

У цілому *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko* характеризується специфічною вірулентністю до багатьох видів гризунів і є непатогенними для людини, свійських тварин. Найбільш чутливими до зараження цими бактеріями є миші – домова, лісова, миша-малютка, полівки – звичайна, стадна, темна, малоазійська, кущова, водяна, степова, – саме ці гризуни є найпоширенішими шкідниками.

Зараження гризунів відбувається при поїданні бактеріальних препаратів у чистому вигляді або разом із приманками. Бактерії надходять у шлунок і далі у кишечник тварини, звідки через стінки кишечника і лімфатичні вузли потрапляють у кров, паренхіматозні органи і спричинюють септичний процес у гризунів. Першими ознаками хвороби є підвищення активності мишовидних гризунів. Потім вони стають в'ялими, малорухливими. Загибель тварин починається через 3-5 діб і триває 2-4 тижні.

⑥ Особливий інтерес для біологічного захисту рослин становить родина ентомофторових грибів *Entomophthora*, майже всі представники якої є паразитами комах. Представники родини утворюють слабо розгалужений міцелій з великою кількістю жирових крапель. У заражених комах він розпадається на окремі гіфальні тіла різної форми і розміру. Тривалість періоду

від проростання конідій до гибелі комах становить від 2-3 (попелиці) до 5-8 днів (сарана). Господар гине внаслідок порушення циркуляції гемолімфи, токсинів і ферментів, які виділяються грибом.

До складу родини входять три роди: ентомофтора (*Entomophthora*), масоспора (*Massospora*) і тарихіум (*Tarichium*). За кількістю видів найбільший рід ентомофтора. До нього належить понад 60 видів грибів. Представники роду уражують комах, які належать до 12 рядів, кліщів, павуків, багатоніжок тощо. Представники роду масоспора більш вузькоспеціалізовані.

Крім грибів родини ентомофорових важливе значення у захисті рослин мають:

*Beauveria bassiana* Bals. Vuil. – розвивається в личинках та імаго багатьох лускокрилих, прямокрилих, твердокрилих, і різних видах кліщів. У природних умовах гриб обумовлює виникнення епізоотій у різних комах: кукурудзяного метелика, личинок колорадського жука, клопа черепашки, яблуневої плодожерки та інших шкідників (до 150 видів).

*Metarhizium anisoplia* Metsch. розвивається на личинках жуків коваликів, хлібних жуків, звичайного бурякового довгоносика, гусеницях лускокрилих (американський білий метелик). За даними дослідників, цей гриб може уражувати понад 200 видів комах.

*Arthrobotrys oligospora* Fres. – хижак багатьох видів нематод, патогенних для сільськогосподарських рослин, людини, тварин.

На основі *Beauveria bassiana* випускають інсектицидний препарат *боверін*, який використовують проти колорадського жука в період масового відродження личинок на картоплі. Для виготовлення інсектицидного препарату використовують штам *B. bassiana* ATCC 74040, який є високовірулентним до бавовникового довгоносика, білянок солодкої картоплі та бавовникових сліпней.

Як і більшість ентомофорових грибів, *Beauveria bassiana* ініціює зараження шляхом проростання спори (конідії), що прикріпилася до кутикули комахи-

господаря. *B. bassiana* прикріплюється дуже міцно до кутикули комахи-шкідника і, як правило, не видаляється звичайним доглядом комахи за нею. Гриб пронизує покриви шкідника-мішені, інвазійні гіфи починають входити до тканин і розгалужуватися через гемоцель. Гіфальні тіла або сегменти гіфів поширюються в гемоцелі, наповнюючи гинучу комаху міцелієм. Гіфи проростають крізь зовнішні покриви і утворюють спори на зовнішніх покривах комахи. Ці спори, або конідії, розповсюджуються в середовищі і здатні спричинити зараження нових комах-шкідників. Загибель господаря відбувається в наслідок виділення грибних токсинів та руйнування тканин комахи.

Загибель комах-шкідників настає впродовж 3-10 діб після застосування препарату. Препарати випускають з концентрацією від  $2 \cdot 10^8$  до  $2 \cdot 10^{14}$  спор на мл носія. Норми використання становлять від  $2,5 \cdot 10^{12}$  до  $25 \cdot 10^{12}$  на га.

Для посилення інсектицидної активності препарату виготовляють біопестицидні композиції, що містять штам *Beauveria bassiana* ATCC 74040 та стимулятор харчування і феромон. У цьому випадку посилюється контакт з грибом завдяки атрактантам. Стимуляторами харчування можуть бути білки (соєві боби, насіння бавовнику), вуглеводи (цукор) та ліпіди (бавовникова, кукурудзяна, соєва олія).

Крім боротьби з комахами-шкідниками мікроміцетні препарати можуть використовуватися для захисту рослин від збудників грибних хвороб. Для біологічного захисту використовуються препарати на основі представників роду *Trichoderma*. Найчастіше використовують види *Trichoderma harzianum* і *Trichoderma viride*. Природнім місцем мешкання представників роду *Trichoderma* є ґрунт. Відома антагоністична активність представників роду *Trichoderma* щодо недосконалих грибів родів *Aspergillus* і *Fusarium*.

*Триходермін* екологічно безпечний біологічний фунгіцидний препарат створений на основі грибів роду триходерма – *Trichoderma lignorum*. Антагоністичні властивості цього гриба пов'язані із його здатністю продукувати

антибіотики, які знищують збудників захворювань рослин, та використовувати грибниці інших мікроміцетів як поживне середовище.

Триходермін застосовується проти сірої і білої гнилі, чорної ніжки, парші, фузаріозу, аскохітозу, фітофторозу тощо. Триходерма сприяє підвищенню активності клітинного соку і тим самим сприяє підвищенню стійкості до захворювань. Чудові результати дає використання препарату в закритих ґрунтах. Він пригнічує розвиток патогенів, збагачує ґрунт поживними речовинами, стимулює ріст і розвиток рослин.

⑦ Основна перевага біологічних препаратів – специфічність дії на організми, що є запорукою їх безпечності для здоров'я людини. Однак, необхідні певні методи контролю за їх виробництвом і застосуванням задля максимальної безпечності. Так, новий препарат можна запустити у виробництво тільки з дозволу Державної комісії, що відає випуском та застосуванням хімічних та біологічних засобів у боротьбі зі шкідниками, збудниками хвороб та бур'янами. При цьому однією з вимог до нового препарату є його оцінка на безпечність для людини та тварин.

Нині найпоширенішими біоінсектицидними препаратами є препарати на основі *B. thuringiensis*. У США та деяких інших країнах перевірку безпечності ентомопатогенних бактерій було здійснено на добровольцях. Було поставлено досліди з вдиханням та заковтуванням 18-ма добровольцями ендотоксину *B. thuringiensis*, які попередньо пройшли медичний огляд і лабораторне обстеження. Усі учасники дослідження залишались абсолютно здоровими. Дані, отримані на людях, включали також відомості про вісім службовців, причетних до виготовлення бактеріальних препаратів. У цьому випадку також не було виявлено жодної шкоди для здоров'я від роботи безпосередньо з препаратом.

Відсутність патогенної дії кристалоутворюючих бацил було показано на 11 видах ссавців (білі миші, пацюки, мурчаки, кролі, велика рогата худоба, вівці,

свині, бурундуки тощо) та на 7 видах птахів (фазани, куріпки, курчата, кури, горобці, шпаки, качки) і 7 видах риб (форель, короп, окунь, молодь лосося, гамбузія та акваріумні риби). Встановлено, що *B. thuringiensis* та препарати на її основі практично не шкодять бджолам.

Досвід роботи з ентомопатогенними вірусами засвідчує, що на здоров'ї осіб, які працювали з ними, це не позначалося. Досліджували пероральне введення вірусу поліедрозу бавовникової совки добровольцям. Кожен із десяти чоловіків та жінок після прискіпливого медичного обстеження протягом п'яти днів одержав 5,82 млрд. поліедрів. Помітних змін у самопочутті будь-кого зі складу контрольних чи дослідних груп не виявлено. Через два роки після дослідів всі члени обох груп були цілком здоровими. В іншій роботі досліджували сироватку крові семи лаборантів, які працювали з вірусами ядерного поліедру шовкопряда-недопарки і пильщика рудого на наявність антитіл до вірусних чи поліедрозних білків. Антитіл до вірусних чи поліедрозних білків не було виявлено. Поряд з цим серологічно порівнювали згадані віруси з арбовірусами везикулярного стоматиту, енцефаломієліту коней, жовтої лихоманки, а також з вірусами лімфоцитарного хориомененгіту. Віріонні і поліедренні білки вірусів ядерного поліедру серологічно відрізнялися від білків усіх перелічених вірусів.

Є відомості, що в осіб, які працювали з грибом *Beauveria bassiana*, препарати спор спричиняли помірні й сильні алергічні реакції. Це проявлялося у формі втоми, нездужання, головного болю тощо. У більшості випадків ці симптоми швидко минали.

Отже, серед мікробіологічних препаратів жоден не завдає шкоди здоров'ю персоналу, який має з ними контакт. Однак не можна виключати можливість розвитку алергічних реакцій на ці препарати. Тому важливо при роботі з препаратами забезпечити автоматизацію виробничих процесів, герметизацію апаратури, застосовувати індивідуальні захисні засоби, захищаючи шкіру, очі і верхні дихальні шляхи від забруднення мікроорганізмами та біопрепаратами.



Встановлено, що, як правило, прямого специфічного впливу ентомопатогенних вірусів та бактерій на корисну фауну безхребетних не спостерігається. Однак зниження чисельності фітофага за застосування мікробіологічних препаратів опосередковано впливає на паразитів і хижаків, оскільки при цьому погіршується забезпеченість останніх кормом. Більшою мірою це позначається на високоспеціалізованих ентомо- та акарифагах.

Первинний контакт мікробіологічних препаратів завжди відбувається з рослинами, що є кормом для комах-шкідників. Очевидно, взаємовідносини цих препаратів з рослинами обмежуються адсорбцією на поверхні листя та стебел. Будучи природними елементами біоценозів, ентомопатогенні мікроорганізми не завдають шкоди рослинам. Більше того, внесення ряду бактерій у ґрунт і на частини рослин сприяє росту сільськогосподарських культур і збільшенню врожаю. Однією з таких бактерій є *B. thuringiensis*.

У цілому мікробіологічні засоби захисту рослин досить безпечні для людини та навколишнього середовища, що робить їх незамінним елементом системи захисту рослин.

⑧ Отримання біотехнологічних препаратів передбачає не лише отримання в достатньому обсязі біологічно активної речовини чи мікроорганізмів, а й створення препаративних форм, які дозволяють тривалий час підтримувати вихідні властивості біотехнологічних об'єктів та забезпечують оптимальний контакт з шкідливим організмом. Для цього використовують наповнювачі, консерванти, активатори, емульгатори, прилипачі, піноутворюючі речовини.

Як наповнювачі у складі біотехнологічних препаратів можуть бути використані рідкі (вода, гліцерин, олії) та тверді (глини, знежирене борошно сої, насіння бавовнику) речовини. Всі ці речовини є біологічно інертними.

Біотехнологічні препарати для захисту рослин випускають у різних формах:

Порошки, що змочуються – механічна суміш діючої речовини нейтрального наповнювача з додаванням поверхнево-активних речовин. До їх складу, як обов'язкові компоненти, входять змочувачі (вода) та стабілізатори, що забезпечують швидке утворення суспензії і повільне осадження твердих часток. Випускаються також заводські водні концентрати суспензії. Змочувані порошки найширше застосовують у захисті рослин.

Концентрат емульсії – це суміш розчину технічного продукту діючої речовини в органічному розчиннику з емульгатором. Для виготовлення робочої рідини заводський препарат розводять водою до одержання водної емульсії потрібної концентрації. У формі концентратів масляних емульсій можуть бути виготовлені вірусні й бактеріальні препарати. Масляні емульсії містять емульгатори і солярові дистилати нафти.

Водні розчини – технічні продукти деяких пестицидів, які добре розчиняються у воді, тому випускаються у формі концентрованого розчину, який розводять водою подібно до концентрату емульсій.

Гранульовані пестициди – препарати у формі гранул розміром 0,2 -4 мм, що складаються із суміші пестициду і наповнювачів (суперфосфату, комплексних мінеральних добрив) і призначені для поверхневого розсіювання або внесення у ґрунт. Гранульовані пестициди є однією з перспективних форм пестицидів. Ця форма дозволяє найбільш ефективно регулювати вихід діючої речовини в навколишнє середовище і обмежити її дію. Гранульовані та капсульовані препарати найчастіше застосовують проти шкідників, які живуть у ґрунті, та кореневих патогенів. Гранули й капсули при цьому захищають діючі компоненти препарату від шкідливої дії факторів навколишнього середовища. У гранулах активна речовина розподілена рівномірно, а в капсулах вкривається захисною оболонкою. Як захисні матеріали звичайно використовують полімери.

Дусти – порошкоподібні препарати для обпилювання. Вони складаються з діючої речовини, нейтрального наповнювача і відповідних добавок у вигляді

порошків. Діючої речовини в дустах не більше 15 %. У формі дустів можна виготовляти вірусні, грибні та протозойні препарати.

Пасти – за консистенцією нагадують замазку, вміщують діючу речовину і воду. Використовуються для обмазування ран плодових культур, а також для виготовлення суспензії. Пасти або концентрати стабілізованих суспензій практикують при виробництві тих біологічних препаратів, до складу яких входять мікроорганізми. Особливе значення при виробництві паст має введення до їх складу консервантів, що запобігають розвитку сторонньої мікрофлори, наприклад, гліцерину.

#### **Питання для контролю:**

1. Хвороби рослин: поняття, причини виникнення, класифікації.
2. Що таке фітопатогени, які вони бувають, як розповсюджуються та проникають у рослини?
3. Поняття, класифікації і проблеми при застосуванні пестицидів.
4. Що таке біологічних захист рослин та які його завдання?
5. Які існують прийоми і методи біологічного захисту рослин та як їх доцільніше застосовувати?
6. Характеристика вірусних препаратів для захисту рослин і методика їх отримання.
7. Опишіть особливості використання *Bacillus thuringiensis* у боротьбі зі шкідниками рослин.
8. Охарактеризуйте препарати захисту рослин на основі *Salmonella enteritidis*.
9. Особливості виробництва і застосування препарату Боверін.
10. Надайте характеристику фунгіцидного препарату Триходермін.
11. На скільки безпечним є використання біопестицидів?
12. Опишіть препаративні форми біопестицидів.

## Лекція № 3. Культивування рослинних клітин і тканин

1. Загальні положення про культури рослинних клітин і тканин.
2. Особливості калусних клітин.
3. Генетика калусних клітин.
4. Напрями використання культур клітин і тканин рослин.

① Культивування клітин, тканин і органів рослин називають процес їх вирощування на штучних поживних середовищах в асептичних умовах *in vitro*. Культура ізольованих тканин зазвичай буває представлена калусними або рідше пухлинними тканинами.

*Калусна культура* – це неорганізована проліферуюча тканина, що складається з дедиференційованих рослинних клітин, тобто, клітин, які втратили свою вихідну спеціалізацію. Калус, що означає «мозоль», може утворюватися як на ізольованих шматочках тканини – *експлантах* – *in vitro*, так і на рослині при пораненні.

Найважливіша властивість ізольованої клітини рослини – це здатність давати початок цілій рослині. Процес утворення диференційованих структур рослини з неспеціалізованих клітин отримав назву *морфогенезу in vitro*, а поява інтактною рослини з окремої клітини, протопласту, групи клітин називається *регенерацією*. В основі цієї здатності лежить унікальна властивість рослинних клітин – *тотипотентність*, тобто здатність клітини реалізувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток цілого організму. В природних умовах тотипотентність у рослин реалізується при загоєнні ран, коли на поверхні ураження відбувається розвиток калусу.

Калусна тканина *in vitro* в основному буває білого або жовтуватого, рідше світло-зеленого кольору. Дуже рідко вона може мати інтенсивне зелене забарвлення (у мандрагори). Темно-коричневе забарвлення виникає частіше

при старінні калусних клітин і пов'язане з накопиченням в них фенолів. Останні окислюються в хінони. Для позбавлення від них у поживні середовища вносять антиоксиданти.

Калусна тканина аморфна і не має конкретної анатомічної структури, але в залежності від походження і умов вирощування вона може бути різної консистенції:

- 1) рихлої, яка складається з переводнених клітин і легко розпадається на окремі дрібні агрегати;
- 2) середньої щільності з добре вираженими меристематичними центрами;
- 3) щільною, в якій диференціюються елементи камбію і провідної системи.

Обов'язковою умовою дедиференціації рослинної клітини і перетворення її в калусну є присутність у поживному середовищі представників двох груп фітогормонів: ауксинів і цитокінінів. *Ауксини* викликають процес дедиференціації клітини, що готує її до поділу, а *цитокініни* – проліферацію (поділ) неспеціалізованих клітин. Якщо в живильне середовище без гормонів помістити шматочок стебла, листка, кореня (без верхівки) або будь-який інший рослинний експлант, що складається зі спеціалізованих (диференційованих) клітин, то поділ клітин не відбудеться і калусна тканина не утвориться. Це пов'язано з нездатністю диференційованих клітин до поділу.

Кожна клітина проходить три фази росту: 1) поділ; 2) розтягнення; 3) диференціація. Характерною рисою заключної фази росту є потовщення вторинної клітинної оболонки і втрата клітиною здатності до поділу. Для того щоб спеціалізовані клітини знову набули здатності до поділу, необхідно, щоб відбулася їх дедиференціація, тобто повернення до меристематичного стану. Розмноження дедиференційованих клітин призводить до анархічного, неорганізованого росту, в результаті чого утворюється калусна тканина. Таким чином, перетворення спеціалізованої клітини в калусну пов'язано з індукцією клітинного поділу, здатність до якого вона втратила в процесі диференціювання.

Перехід клітини *in vitro* зі спеціалізованого стану до дедиференціювання і активним клітинним поділам обумовлений зміною активності генів або їх блоків (епігеномна регуляція). Активація одних генів і репресія інших призводить до змін у білковому складі клітин.

Дедиференціація починається з використання запасних речовин і руйнування спеціалізованих клітинних органел. Через 6-12 год. після індукції дедиференціація клітинна стінка розрихлюється і розбухає, збільшується число вільних рибосом, число елементів апарату Гольджі, а також розміри і число ядерця. Всі ці зміни передують початку поділів, які починаються через 48-72 год. Калусне диференціювання за своєю суттю є вторинним.

Для того щоб не відбулося старіння, втрати здатності до поділу і загибелі калусних клітин, первинний калус, що виникає на експлантах, через 4-6 тижнів переносять на свіже поживне середовище. При регулярному пасируванні здатність до поділу може підтримуватися протягом десятків років.

② Калусні клітини *in vitro* зберігають ряд фізіолого-біохімічних властивостей, притаманних нормальним клітинам рослин. Зокрема, вони зберігають здатність до синтезу вторинних метаболітів, їм властива фотоперіодична реакція, що пов'язано зі збереженням активності фітохрому. Калусні клітини здатні зберігати стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, засолення.

Разом з тим калусні клітини мають специфічні властивості. У них з'являються специфічні білки і зменшується кількість білків, характерних для фотосинтезуючих клітин, або вони зовсім зникають. Калусні клітини відрізняються великою генетичною гетерогенністю і фізіологічною асинхронністю.

У результаті виходу з-під контролю організму ріст калусних клітин відбувається неорганізовано, асинхронно і є необмеженим. Спостерігається

гетерогенність за віком оскільки у калусних тканинах одночасно присутні молоді (G1-фаза) і старі (S- і G2-фази) клітини. Клітинний цикл у них більш тривалий, ніж у рослин, які ростуть у відкритому ґрунті.

Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні калусних клітин. Вони споживають менше кисню в порівнянні з нормальними, що характерно і для меристематичних клітин, які активно діляться. Дихальний коефіцієнт (Д.К.) калусних клітин більше 1, що свідчить про зсув співвідношення між диханням і бродінням у бік посилення останнього, що підтверджується накопиченням етилового спирту в клітинах.

Мітохондрії в калусних клітинах так само, як і в меристематичних, є слабо розвиненими, в них мало крист, що впливає на активність аеробного дихання.

③ Тривалий час вважали, що калусні клітини генетично однорідні. Однак у 60-х роках ХХ ст. було з'ясовано, що клітини калусних тканини володіють вираженою генетичною гетерогенністю. Генетично стабільними *in vitro* є меристематичні тканини.

У калусних і суспензійних культурах зустрічаються клітини, які мають диплоїдний набір хромосом, властивий вихідній рослині, а також поліплоїдні. У культурі калусних тканин можна нерідко спостерігати анеуплоїдів. Чим довше культивуються калусні клітини, тим більше вони відрізняються за плоїдністю. Цей факт вказує на те, що зміна плоїдності відбувається під впливом умов культивування і насамперед речовин, які входять до складу поживного середовища. З іншого боку поліплоїдні клітини мають меншу лаг-фазу і тому швидше переходять до поділів, ніж диплоїдні. Внаслідок цього вони і отримують перевагу при подальших пасажах.

Крім зміни плоїдності, культивування клітин і тканин рослин *in vitro* зумовлює виникнення в клітинах хромосомних аберацій. Останні позначаються

на біологічних особливостях культивованих тканин, змінюючи їх зовнішній вигляд, обмін речовин, швидкість росту.

Існує декілька причин генетичної нестабільності культивованих клітин:

- 1) Генетична неоднорідність вихідного матеріалу (гетерогенність експлантів). У багатьох рослин диференційовані тканини характеризуються наявністю клітин різної плоїдності і лише активно проліферуючі протягом онтогенезу тканини (верхівкові меристеми, камбій тощо) залишаються завжди диплоїдними;
- 2) Тривале пасирування тканинних і клітинних культур, що призводить до накопичення в них генетичних змін;
- 3) Порушення кореляційних зв'язків тканин рослин при ізоляції, що може бути пов'язаним із впливом на генетичний апарат клітини фітогормонів поживного середовища. У якості гормонів у поживних середовищах для калусоутворення обов'язково входять ауксини і цитокиніни. Про мутагенну дію цих речовин відомо з цілого ряду робіт. Найбільш активним мутагенним препаратом є 2,4-Д, що входить до складу більшості поживних середовищ. Цитокиніни, зокрема кінетин, сприяють поліплоїдизації клітин.

Генетична варіабельність калусних клітин дозволяє використовувати їх для клітинної селекції на стійкість до несприятливих факторів середовища, фітопатогенів і на підвищену продуктивність.

④ Клітинна біотехнологія базується на здатності клітин існувати і розмножуватись *in vitro*, їх тотипотентності і регенерації. Роль культури ізольованих клітин і тканин слід розглядають в декількох напрямках.

Перший напрямок пов'язаний зі здатністю ізольованих рослинних клітин продукувати цінні речовини вторинного синтезу (алкалоїди, стероїди, глікозиди, гормони, ефірні олії тощо) для медицини, парфумерії, косметики, харчової промисловості та інших галузей. Як правило, вторинні речовини отримують з



калусної тканини, вирощеної на твердому (агаризованому) або рідкому (суспензійна культура) поживному середовищі. На сьогодні з використанням культури клітин рослин розроблено технології промислового отримання протипухлинних препаратів типу таксол, кампотецин; антивірусних препаратів; адаптогенних та стимулюючих препаратів; тощо. Продуктивність культивованих клітин в результаті клітинної селекції може значно перевищувати продуктивність цілих рослин. Перевагою такого способу отримання речовин вторинного синтезу є також можливість використовувати рослини, які не ростуть в наших природних умовах, та отримувати продукцію цілий рік.

Другий напрямок – це використання культури ізольованих тканин для розмноження та оздоровлення посадкового матеріалу. Цей метод, названий *клональним мікророзмноженням* рослин, дозволяє отримувати з однієї меристеми сотні тисяч рослин на рік.

Третій напрямок – використання ізольованих клітин в селекції рослин, що дає можливість отримувати рослини зі швидким ростом, стійкі до різних несприятливих факторів середовища: посуха, засолення, низькі і високі температури, фітопатогени, важкі метали тощо. Разом з тим цей напрямок передбачає створення нових рослин шляхом злиття ізольованих протопластів та отримання нестатевих (соматичних) гібридів. Культивування ізольованих пиляків і сім'ябруньок на штучних поживних середовищах дає можливість отримувати гаплоїди, культивування зародків дозволяє отримувати рослини з гібридного насіння, яке не здатне сходити (з погано розвиненим ендоспермом). Запліднення в пробірці дозволяє подолати несхрещуваність деяких рослин.

Четвертий напрямок пов'язаний з використанням культур рослинних клітин та тканин для створення нових форм методами генетичної інженерії.

П'ятий напрямок пов'язаний з тим, що культура рослинних клітин *in vitro* є вкрай важливою для збереження видів, що знаходяться на межі вимирання. Клітини рослин при цьому можуть зберігатися як в живій колекції (яка потребує

постійних пересівів), так і в замороженому стані (кріоконсервація в рідкому азоті).

Отже, успіх у застосуванні культури клітин і тканин в першу чергу залежить від оптимізації фізіологічних процесів, що забезпечує нормальний поділ клітин, їх диференціацію і регенерацію з них дорослих рослин. Найбільш складною є регенерація рослин з окремих клітин. У першу чергу це стосується злакових рослин. Тому найважливіше значення має з'ясування механізму морфогенезу *in vitro*, регенерації і процесів, які лежать в їх основі.

#### **Питання для контролю:**

1. Калусна культура: характеристика, властивості, консистенція.
2. Фази росту клітин. Умови і принципи утворення калусних клітин.
3. Спільні і відмінні риси калусних клітин по відношенню до нормальних.
4. У чому полягає суть генетичної гетерогенності калусних клітин?
5. Поясніть причини генетичної нестабільності клітин у культурі.
6. Напрямки використання ізольованих клітин і тканин рослин.

## Лекція № 4. Трансгенні рослини

1. Цілі і переваги створення трансгенних рослин.
2. Етапи та підходи генетичної трансформації рослин.
3. Підвищення продуктивності рослин та покращення їх якості методами генетичної інженерії.
4. Трансгенні рослини стійкі до стресових факторів.
5. Трансгенні рослини стійкі до комах.
6. Трансгенні рослини стійкі до фітопатогенів.
7. Отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів.
8. Трансгенні рослини – продуценти лікарських препаратів.

① Одним із шляхів підвищення ефективності сільського господарства, і зокрема рослинництва, є максимальне використання біологічного потенціалу сільськогосподарських культур. Перспективним в цьому напрямі є використання досягнень *генетичної інженерії* – як комплексу підходів та методів, що дозволяють вносити спрямовані зміни в геном рослин.

Отримання традиційних продуктів від трансгенних рослин, які застосовуються для їжі, для годівлі тварин, у промисловості, є економічно вигідним, що підтверджується щорічним збором мільйонів тон урожаю із сільськогосподарських угідь. У зв'язку з цим широко ведуться дослідження з метою удосконалення якісних характеристик продукції рослинництва. Зокрема, шляхом генетичної трансформації рослин ведуться роботи, спрямовані на зменшення накопичення шкідливих речовин, збільшення накопичення корисних, а також на підвищення дієтичних, харчових, смакових якостей продукції. Прикладом робіт зі зменшення накопичення токсичних речовин може бути створення батату, який не накопичує ціаногенні глікозиди в коренях та листках. Такі ціаногенні глікозиди, як лінамарин та лотаустралін, викликають

різні захворювання, разом з тим батат є важливим продуктом харчування близько 400 млн. чоловік.

Серед генів, експресія яких у рослинах вважається екзотичною, найбільш актуальними є гени, які кодують синтез поліпептидів, важливих для медицини (фармацевтичних білків, антитіл, вакцин). Такі білки та пептиди називають *рекомбінантними*, тому що їх отримують з використанням технології рекомбінантних ДНК.

Рослина як природний «біореактор» з виробництва рекомбінантних білків, важливих для медицини, має певні переваги порівняно з клітинами тварин та мікроорганізмів:

- 1) Рекомбінантні білки, синтезовані в рослині, не потрібно піддавати денатурації та ресинтезу.
- 2) Рослини здатні не лише до синтезу і накопичення, а й до глікозилювання білків тварин, що вкрай необхідно для синтезу антитіл та інших функціонально повноцінних білків.
- 3) Рослини забезпечують значне здешевлення виробництва рекомбінантних білків, причому без обмежень, пов'язаних зі зростанням обсягів такого виробництва. Наприклад, якщо середня вартість очищених пептидів, отриманих за допомогою інших сучасних методів, становить 0,1-1 млн. \$ за 1 кг, то їх вартість у разі отримання із трансгенних рослин дорівнює 1000 \$ за 1 кг.
- 4) У препаратах, отриманих із рослин значно менше або ж зовсім відсутні небажані віруси, а також відсутні домішки, що мають алергічну, імуносупресивну, канцерогенну, тератогенну дію на організм людини. Це зумовлює порівняну легкість очищення синтезованих рослинами фармацевтичних пептидів.
- 5) Під час вживання сирих овочів і фруктів, які містять гени, що кодують синтез білків-вакцин, відбувається оральна імунізація організму. Це має величезне

економічне значення, особливо для країн, що розвиваються, у зв'язку зі значним здешевленням отримання оральних вакцин і відсутністю необхідності очистки у випадку переносу цих генів у фрукти та овочі, що вживаються в сирому вигляді.

② *Генетична трансформація* – це спрямована модифікація геному рослинної клітини очищеною чи рекомбінантною ДНК з клітин іншого організму, яка інтегрується в геном реципієнтної клітини, що модифікується.

У загальному вигляді процес трансформації складається з наступних етапів:

- 1) пошук, ідентифікація і виділення генів, що відповідають за ознаку, яку необхідно прищепити рослині-реципієнту;
- 2) введення гену в геном клітин рослин-реципієнтів;
- 3) відбір на спеціальних середовищах трансформованих клітин;
- 4) регенерація трансгенних рослин;
- 5) тестування експресії вбудованого гену в геномі трансгенної рослини.

Існує кілька підходів генетичної трансформації рослин та, відповідно, індукції синтезу рекомбінантних білків:

- 1) Отримання трансгенних рослин із вбудованими в хромосомах генами рекомбінантних білків. Такі рослини вже отримані, деякі з них випробовують для комерційного використання. Недоліком цього підходу є відносно невисока концентрація рекомбінантного білка, що зменшує можливість використання таких рослин для виробництва очищених препаратів, тому ця технологія застосовується для виробництва їстівних вакцин або інших білків, які можуть споживатись в неочищеному стані. Модифікації, що ґрунтуються на можливості як спонтанної, так і індукованої секреції (ексудації) рекомбінантних білків у поживне середовище у разі вирощування трансгенних рослин в умовах гідропоніки, застосовують для отримання очищених препаратів рекомбінантних білків.

2) Використання трансформації хлоропластів. Цей метод дає змогу різко збільшувати кількість потрібного білка в листках трансформованих рослин. Так, накопичення соматотропіну людини, ген якого було внесено в хлоропласти тютюну, становило до 7% усього розчинного білка трансформованої рослини. В окремих випадках рівень рекомбінантного білка може навіть досягати понад 40% сумарного розчинного білка, проте широке застосування цієї технології поки що стримується труднощами трансформації хлоропластів.

3) Використання позаклітинних генетичних елементів. Перші подібні генетичні конструкції створено на базі РНК-вмісного вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). Ген біосинтезу цільового білка клонують під контролем промотору вірусу (звичайно використовують субгеномний промотор білка оболонки вірусу) у бактеріальному векторі, який містить повну ДНК копію вірусної РНК, потім у безклітинній системі на основі отриманого вектора синтезується вірусна РНК, яка наноситься на пошкоджені листки тютюну або споріднених видів. Протягом 1-2 тижнів відбувається накопичення вірусних часточок, що містять рекомбінантний білок. Така система дає змогу за короткий термін накопичувати значну кількість цільового рекомбінантного білка в листках інфікованої рослини (2-10%, іноді до 20% загальної кількості рослинного білка).

Загалом процес трансформації рослинної клітини може бути здійснено або при використанні механізмів природного обміну генетичним матеріалом в ході взаємодії з рослиною бактерій роду *Agrobacterium*, або шляхом прямого введення рекомбінантних ДНК в клітини рослин.

③ Одним з основних завдань поліпшення рослин є підвищення якості синтезованих продуктів: білків, жирів, поліцукрів та інших речовин, що визначають їх поживну і технічну цінність.

У злаків найбільший інтерес представляють запасні білки ендосперму. Вони в основному кодуються декількома, подібними за своєю структурою і нуклеотидним складом, генами, поєднаними в мультигенну родину. Зазвичай експресія цих генів суворо тканинспецифічна і відбувається на певній стадії розвитку рослини. У більшості випадків запасні білки рослин мають незбалансований для харчування людини і тварин амінокислотний склад. Так, запасні білки бобових (легуміни) характеризуються низьким рівнем амінокислоти метіоніну, а запасні білки злаків (проламіни) бідні на лізин, триптофан і треонін. Дефіцит цих амінокислот знижує поживну і кормову цінність насіння.

Поліпшення амінокислотного складу білка методами традиційної селекції досить ускладнено у зв'язку з тим, що гени, які визначають ці важливі сільськогосподарські ознаки, часто бувають зчеплені і успадковуються разом з генами, що викликають небажані ознаки.

У зв'язку з цим найбільш перспективним є використання генно-інженерних методів при створенні нових сортів, що дозволяє ввести в геном тільки корисну ознаку, без зчеплення з небажаними властивостями. Так, наприклад, введення додаткових кодонів лізину в гени проламіну може призвести до синтезу білків, збагачених лізином, і поліпшенню кормової та поживної цінності білка. Технологія генно-інженерного поліпшення якості рослин і продукції, яку від них отримують, включає ряд етапів:

- 1) клонування генів запасних білків;
- 2) вивчення механізмів тканинспецифічного та тимчасового синтезу білків і визначення послідовностей ДНК, які визначають і регулюють таку специфічну експресію генів відповідних білків;
- 3) цілеспрямована зміна послідовності генів запасних білків з метою поліпшення амінокислотного складу;
- 4) створення векторів, які містять змінений ген;

- 5) введення модифікованих генів у рослини;
- 6) тестування експресії генів та якості продукції.

Отримання трансгенних рослин з поліпшеними якостями зерна неможливо без підготовчого етапу, який включає детальне вивчення як послідовності самого гена, так і його елементів, що беруть участь у регуляції синтезу білка.

Вченими вже охарактеризовані десятки генів запасних білків злаків, бобових і ряду інших рослин, вивчені їх структура і регуляція експресії. Дослідники вже клонували 10 генів гордеїнів ячменю, гени  $\alpha$ - і Р-гліадинів і глютеніну пшениці, зеїну кукурудзи, легумінів бобових, пататину картоплі тощо. Для деяких генів визначена їх нуклеотидна послідовність.

Синтез запасних білків має жорстку регуляцію: гени експресуються тільки в єдиній тканини (проламіни злаків тільки в ендоспермі зерна) і протягом короткого періоду розвитку зерна. Дослідження генів запасних білків показало спільність їх будови, що є логічним, оскільки вони виконують однакову функцію. Так, загальним для переважної більшості генів запасних білків є відсутність інтронів. Крім цього, у них на відстані 300 п.н. від точки початку транскрипції розташована специфічна послідовність у 25 п.н., названа *ендосперм-боксом*. Була визначена функція ендосперм-боксу і показано, що саме від присутності цієї 25-нуклеотидної послідовності залежить тканинспецифічна експресія генів запасних білків в ендоспермі зерна. Більше того, продукт будь-якого гена, перед яким розташовується послідовність ендосперм-боксу, синтезується тільки в насінні або зернах, а тому буде логічним його включення до складу векторів, що містять модифіковану послідовність генів проламінових білків з метою їх подальшого депонування в насінні або зернах.

Загальний план ізолювання генів запасних білків включає наступні етапи:

- 1) отримання і часткове очищення відповідної мРНК;
- 2) синтез і клонування кДНК;
- 3) виділення з геномних бібліотек послідовності гена запасного білка.



Для отримання трансгенних рослин з поліпшеним амінокислотним складом білка застосовують олігонуклеотид-спрямований мутагенез. Такий підхід дозволяє вводити у відповідний ген додаткові кодони, наприклад, лізину, метіоніну, треоніну. Отримані модифіковані гени експресували білок, збагачений відповідними амінокислотами. Вперше така робота була проведена по введенню нових кодонів лізину у послідовність гену  $\alpha$ -зеїну кукурудзи. Нині введення нових триплетів для зміни амінокислотного складу білків є звичайним.

Одним з нових підходів до поліпшення складу білків є конструювання химерних генів на основі відомої послідовності генів запасних білків одно- і дводольних. У якості донорних були використані гени гордеїну В1 ячменю і легуміну В4 бобів. Конструкцією, яка містить такий химерний ген, були трансформовані рослини тютюну та отримані трансгенні лінії рослин.

Таким чином, стає реальною можливість маніпулювання білковим складом ендосперму зернових методами генетичної інженерії.

Крім отримання рослин зі зміненими запасними білками було показано, що трансгенні рослини можуть бути використані у якості виробників «їстівних» вакцин. Також проводяться роботи з покращення складу жирних кислот ряду олійних культур, і в першу чергу ріпаку.

Одним із пріоритетних напрямків в селекції є підвищення врожайності нових сортів. Генно-інженерні розробки активно ведуться в наступних напрямках: збільшення фотосинтетичної активності і збільшення синтезу окремих речовин.

Роботи зі збільшення фотосинтетичної активності проводяться в напрямку введення генів С4 фотосинтезу в С3-рослини. Аналіз отриманих трансгенних рослин показав, що активність ферменту в трансформованих клітинах в 2-3 рази вища, ніж у рослини-донора гена, що призвело до збільшення фотосинтетичної активності і врожайності.

Крім цього були ідентифіковані гени, які контролюють кількість хлоропластів у клітині. Використання таких генів також призводить до зміни рівня фотосинтезу. Інший підхід заснований на збільшенні вмісту хлорофілу у кожному хлоропласті.

Ще один напрямок поліпшення рослин стосується можливостей зміни їх метаболізму методами генетичної інженерії. Введення гена цукрозофосфатсинтетази кукурудзи (SPS-гена), що є ключовим ферментом у регуляції вуглеводного метаболізму, в геном інших рослин приводило до зміни вуглеводного обміну і підвищенню продуктивності рослин. Нині отримані такі трансгенні рослини томату, картоплі, ріпаку, бавовнику.

Велике зацікавлення викликають дослідження з використання для трансформації антисенсових генів, коли синтезується антисенсова РНК, що пригнічує трансляцію сенсового білку. Наприклад, введення гену, що кодує антисенсову РНК полігалактуронази (ферменту, що відповідає за розм'якшення плодів томатів), призводить до інактивації цього ферменту і подовжує термін зберігання плодів.

④ Екстремальний вплив навколишнього середовища (посуха, надмірне зволоження, вплив високих або низьких температур, засоленість і кислотність ґрунтів, підвищений вміст озону, важкі метали) призводить до значних втрат сільськогосподарської продукції. Тому використання сортів рослин, толерантних до стресових впливів, має велике економічне значення.

Більшість з адаптивних реакцій рослин на стрес обумовлюються синхронною взаємодією безлічі генів. Тому більш доступними для генно-інженерних досліджень виявляються біохімічні процеси, які безпосередньо індукуються фактором стресу. Так, відомо, що в рослинах, які піддаються тривалому водному стресу, накопичується ряд органічних низькомолекулярних сполук, таких, як пролін, гліцинбетаїн, і ряд інших, які слугують осморегуляторами або осмопротекторами.

Була показана схожість стресової відповіді у бактерій і вищих рослин: в обох випадках у клітинах відбувається синтез молекул осмопротекторів, механізмом дії яких є встановлення осмотичного балансу між цитоплазмою і навколишнім середовищем і, крім того, часткова стабілізація білків при стресових умовах. Подібні біохімічні шляхи синтезу молекул осмопротекторів дозволили використовувати гени бактеріального походження для отримання трансгенних рослин, стійких до стресів.

З геному *E. coli* були виділені два гени *proBosm* і *proA*, які кодують ферменти шляху біосинтезу проліну, акумулювання яких у клітині відбувається у відповідь на осмотичний стрес. Експресія цих бактеріальних генів в геномі рослин приводила до підвищеного синтезу проліну. Отримані трансгенні рослини тютюну здійснювали підвищений синтез і накопичення проліну в порівнянні з контрольними рослинами. Трансгенні пагони вкорінювались і могли рости при концентрації солі в середовищі 20 г/л (350 мМ).

Був виділений ген бетаінальдегіддегідрогенази (*BADH*), який каталізує синтез гліцинбетаїну. Трансгенні рослини тютюну, які експресують цей ген, володіють підвищеною солестійкістю.

Було показано, що стійкість до високих температур пов'язана з геном *Fad7*, білок якого впливає на метаболізм жирних кислот. Інактивація такого гена в трансгенних рослинах рису призвела до того, що рослини могли рости при підвищених температурах і витримувати до двох годин при +47°C. Польові випробування сорту трансгенних газонних трав на посухостійкість і стійкість до засолення проходять з тим, щоб надалі їх можна було використовувати у великих містах з характерним абіотичним фоном.

⑤ Використовуючи генно-інженерні методи, можливе конструювання рослин з підвищеною резистентністю до атак комахами. Так, було показано, що бактерії *Bacillus thuringiensis* експресують інсектицидний білок-прототоксин,

який, потрапляючи в кишечник комах, розщеплюється під дією протеаз до активного токсину, що приводить до загибелі шкідників.

Препарати на основі цього токсину використовувались для обробки рослин у полі. Отримані препарати були нестійкими і досить швидко розкладалися, що не дозволяло розвинути у шкідників стійкість до інсектициду, тим часом продукція таких білків у рослинних клітинах могла б забезпечувати стійку резистентність рослин до комах.

З геному *B. thuringiensis* був виділений ген токсину *bt2* і вставлений під контроль промотору 35S CaMV. *bt*-Ген був інтегрований у геном рослин тютюну методом агробактеріальної трансформації. Експресія бактеріального *bt2*-гену в рослинних клітинах була підтверджена як на рівні транскрипції, за присутністю відповідної мРНК, так і на рівні трансляції, за синтезом білка-токсину. Отримані трансгенні рослини тютюну були стійкі до шкідників. Ефективність захисту сільськогосподарських культур від шкідників була показана і на трансгенних рослинах томату, трансформованих генами ендотоксину, при цьому бактеріальний білок, синтезований у тканинах рослин, забезпечував захисний ефект, порівнянний з використанням інсектицидних препаратів.

Крім тютюну та томату бактеріальний *bt2*-ген був введений у геном багатьох сільськогосподарських рослин, у тому числі в картоплю, кукурудзу, бавовник, рис, сою, брокколи тощо. Для ряду культур отримані сорти трансгенних рослин, які експресують у своєму геномі *bt2*-ген. Так, в 1994-1995 рр. були отримані і пройшли польові випробування сорти томату, картоплі і бавовнику (фірма «Monsanto»), кукурудзи як кормової, так і харчової цукрової (фірма «Novartis»), а в 1998 р був отриманий сорт картоплі з потрібною стійкістю, який крім *bt2*-гену, містив ген стійкості до вірусу скручування листя і ген стійкості до гербіциду гліфосату. У 2000 р в країнах з дозволом використання генетично-модифікованих продуктів сортами трансгенних рослин, стійких до комах, були засіяні близько 380 тис. га, з них: 230 тис. га – трансгенним бавовником,

144 тис. га – трансгенною кукурудзою, 5 тис. га – трансгенною картоплею. Використання трансгенних рослин призвело до різкого скорочення застосування інсектицидів і підвищенню урожайності.

⑥ При дії фітопатогенів у рослинах вмикається каскад механізмів захисних реакцій. При цьому активні реакції можуть проходити за двома основними напрямками:

- 1) У відповідь на інфекцію починається синтез сполук, що є токсичними, обмежують життєдіяльність патогенів і в підсумку зумовлюють їх загибель.
- 2) У якості захисної відповіді можуть створюватись структурні бар'єри, які запобігають ушкодженню рослин і поширенню патогенів. Це досягається лігніфікацією клітинних стінок рослин або зміцненням клітинних стінок глікопротеїдами, багатими гідроксипроліном, та інших сполук (екстенсинів), що зумовлюють захист тканин від пошкодження фітопатогенами.

У відповідь на інфікування вірусами, бактеріями і грибами індукуються специфічні PR-білки (pathogenesis related proteins), у тому числі і найбільш вивчені хітинази і  $\beta$ -1,3-глюканази. Ці ферменти пігнічують ріст грибів, а також деяких видів бактерій.

Експериментально встановлено кодування білків хітинази і глюканази одиночними генами. Тому вони були використані в генно-інженерних роботах з отримання трансгенних рослин, стійких до фітопатогенів. Були отримані трансгенні рослини тютюну, бавовни, кукурудзи, ріпаку, томату, рису, картоплі, люцерни, турнепсу та інших, які експресують ген хітинази під контролем промотора 35S CaMV. У цих рослин спостерігалася стійкість до грибної інфекції. На даний момент отримані трансгенні сорти тютюну, ріпаку, томатів, картоплі з підвищеною стійкістю до *Rhizoctonia*, рослини тютюну – до *Cercospora nicotiana*.

Іншу групу сполук, які також володіють фунгіцидним ефектом, представляють низькомолекулярні білки (40-50 кДа), до яких відносяться

цистеїнові білки рослин, інгібітори галактуроназ, рослинні дефензини, група MF-білків. Всі ці білки зазвичай неспецифічно підвищують стійкість рослин до різних грибних і бактеріальних інфекцій. Трансгенні рослини, які експресують цей білок, володіють стійкістю як до грибної, так і до вірусної інфекції.

У процесі вивчення взаємин вірус – рослина було залучено велику кількість різних методів. Тільки їх комбінування могло принести результати з отримання рослин, стійких до вірусної інфекції. За останні роки в цьому напрямку було зроблено помітний ривок, що безпосередньо пов'язано з більш детальним розумінням організації геному і функціонування вірусних генів. Нині для отримання рослин, стійких до вірусної інфекції, за допомогою генно-інженерних технологій існує ряд підходів, які дозволяють отримати трансгенні рослини, трансформовані геном білку оболонки вірусу, що призводить до зменшення інфікованості та пригніченню розмноження вірусу. Таким методом були отримані рослини тютюну і картоплі, трансформовані геном білка оболонки ВТМ, що призвело до появи стійкого антивірусного ефекту у трансгенних рослин.

У теперішній час отримані лінії тютюну, які, крім стійкості до ВТМ, резистентні до вірусу гарбузової мозаїки. Були також отримані рослини картоплі та кукурудзи, стійкі до вірусів скручування листя, і рослини ячменю, резистентні до вірусу карликовості. Також отриманий і вирощується сорт гарбуза, який володіє стійкістю відразу до трьох вірусів.

Ще одним підходом до отримання стійких до патогенів рослин є трансформація рослинних клітин генами, які кодують ферменти шляху біосинтезу фітоалексинів, що проявляють фунгіцидну та антимікробну дію. Трансформація цими генами рослин томату і картоплі значно підвищила стійкість до фітофторозу та фузаріозу, а тютюну – до сірої гнилі.

Нині отримані чотири трансгенних комерційних сорти картоплі, стійкі до Y вірусу (PVY) і вірусів скручування листя (PLRV), сорт гарбуза, стійкий одночасно до трьох різних вірусів, сорт папаї, стійкий до кругового вірусу папаї (PRV).

⑦ Одним з основних напрямків біотехнології рослин є отримання культурних рослин, стійких до впливу гербіцидів. Гербіциди широкого спектру дії, знищуючи бур'яни, справляють гнітючу дію і на посіви. Отримання стійких до гербіцидів рослин ведеться у двох напрямках:

- пряма селекція стійких до гербіцидів форм рослин (в основному, шляхом схрещування з дикими видами рослин, стійких до гербіцидів);
- отримання трансгенних рослин шляхом введення генів, експресія яких зумовлює гербіцидну резистентність.

Теоретичною основою отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів, є дані про молекулярні механізми виникнення такої стійкості і виділення генів як бактеріального, так і рослинного походження, що визначають цю властивість. Дія гербіцидів проявляється у придушенні метаболізму рослинних клітин: інгібуванні біохімічних процесів насамперед фотосинтезу (атразин, симазин, діурон) і синтезу амінокислот (гліфосат, сульфонілсечовина, біалафос). Стійкість до гербіциду виникає або в результаті зміни спорідненості гербіциду з його ферментом-мішенню, або безпосередньо інгібуванням молекули гербіциду.

Отримання рослин, стійких до гербіцидів, методами генної інженерії насамперед базується на вивченні молекулярних механізмів толерантності і включає наступні етапи:

- 1) виявлення мішеней дії гербіцидів у клітині рослин;
- 2) відбір рослин / бактерій, стійких до даного гербіциду;
- 3) ідентифікація і клонування генів резистентності до даного гербіциду;
- 4) вивчення їх експресії для використання в трансгенних конструкціях.

Дія гербіциду атразин заснована на його зв'язуванні з хлоропластним мембранним білком ( $Q_b$ ), який кодується геном *rbcsA*. Останній був виділений з геному деяких бур'янів. Було показано, що стійкість до гербіциду пов'язана з

виникненням точкової мутації в гені *pbcsA*, що призводить до заміни в білку амінокислотного залишку серину на гліцин. Такі заміни в білку  $Q_b$  приводять до різкого зменшення зв'язування гербіциду з ферментом-мішенню. В результаті виникає стійкість до гербіциду. Мутантний ген *pbcsA* був вбудований у векторні конструкції для трансформації рослин. Отримані трансгенні рослини були стійкі до атразину.

Аналогічно було показано, що заміна аланіну на аргінін у білку *EPSP*-синтетази, який кодується геном *aroA E. coli*, призводить до виникнення стійкості до дії гербіциду гліфосату. Це було використано для трансформації клітин тютюну, томатів, цукрових буряків та картоплі мутантним геном *aroA* та отримання трансгенних рослин, стійких до гербіциду.

Введення до геному рослин бактеріального гена *bar* призводить до виникнення стійкості до гербіциду BASTA. Було показано, що білок, який кодується *bar*-геном, – фосфінотрицинацетілтрансфераза – ацетилює активний компонент гербіциду фосфінотрицин, що зумовлює його інактивацію. Отримані сорти трансгенного рису, сорго, пшениці і ряду інших рослин. Останнім часом *bar*-ген став використовуватися і в якості селективного маркера у векторах.

Введення в геном рису гена, який кодує фермент протопорфіриногенсинтетазу (Protox), виділений з бактерій *B. subtilis*, привело до підвищення стійкості трансгенних рослин до гербіцидів дифеніл-ефірного ряду. При цьому був встановлений механізм антигербіцидної дії: підвищений синтез білка Protox нейтралізує дію гербіциду, чим і обумовлено підвищення стійкості до нього. При цьому була показана пряма залежність між числом вбудованих копій гена і рівнем стійкості.

У цілому можна говорити про те, що отримання трансгенних рослин є одним напрямків біотехнології, які найбільш бурхливо розвиваються. Швидкі темпи розвитку генної інженерії рослин призводять до стрімкого зростання оброблюваних площ, зайнятих трансгенними рослинами, з 1,6 млн га в 1996 р,



коли почалося їх обробіток в комерційних масштабах, до понад 80 млн га в 2005 р, що склало близько 5 % всіх орних площ у світі. Цікаво відзначити, що 99% всіх цих площ займають чотири основні трансгенні культури: соя, кукурудза, рапс і бавовник. У 2004 р трансгенними були в США близько 75% бавовни та сої, у Китаї – 53% бавовни, в Аргентині – 99% сої, у Канаді – 63% ріпаку. У 2003 р 75% всіх вирощуваних трансгенних рослин містили ген стійкості до гербіцидів, 21% – ген стійкості до шкідників і майже 8% – більше одного гена стійкості.

⑧ В останні десятиліття почалася розробка векторних конструкцій для отримання трансгенних рослин, які активно продукують білки для медичних цілей, що могли б вживатись безпосередньо в їжу або для виділення з них білкового продукту з подальшим його очищенням. Отримання рекомбінантних білків у рослинах має ряд значних переваг:

- експресія терапевтично важливих білків у рослинах набагато дешевша, ніж у біореакторах з використанням культури клітин ссавців;
- більша безпека рекомбінантних білків, синтезованих у рослинах, у порівнянні з отриманням їх від трансгенних тварин, оскільки в рослинах не розвиваються патогенні для людини віруси і бактерії й можливість зараження кінцевих продуктів мінімальна;
- посттрансляційні зміни білків у рослинних і тваринних клітинах відбуваються однаково, що зумовлює утворення правильної третинної структури, тим часом як саме правильна упаковка еукаріотичної білкової молекули є головною проблемою при синтезі її в бактеріях;
- напрацювання терапевтично важливих рекомбінантних білків у їстівних частинах рослини різко знижує кінцеву ціну продукту через відсутність проблем з очищенням.

Перші дані про можливість використання рослин як «фабрик» для виробництва лікарських білків були отримані 1989 р коли були створені

трансгенні рослини тютюну, що продукують імуноглобуліни IgG1. Нині отримані рослини, які здатні синтезувати різні білки для терапевтичних цілей, у тому числі соматотропін (тютюн), який застосовується у ветеринарії, антитіла проти вірусу герпесу (тютюн, кукурудза, соя), інтерферони для лікування гепатиту В і С (рис, турнепс), лактоферин (картопля), що володіє антимікробною дією, гірудин (рапс) і протеїн С (тютюн), які використовуються для лікування тромбозів, і ряд інших білків.

Окремий інтерес представляє одержання трансгенних рослин, які продукують імунізуючі антигени з тим, щоб отримати їстівні вакцини. Вперше дані про їстівні вакцини були опубліковані в 1992 р, і це була вакцина проти гепатиту В, отримана в рослинах спочатку тютюну, а потім і картоплі. У мишей, в їжу яких додавалась така картопля, спостерігали розвиток імунної відповіді проти вірусу гепатиту. У 1999 р була отримана вакцина проти вірусу гепатиту в результаті трансформації рослин люпину і салату-латуку. Нині вже створені і пройшли клінічні випробування ряд вакцин на основі трансгенних рослин, у тому числі вакцина проти гастроентериту (тютюн, картопля), вірусу кору (латук), холерного віріону (картопля), цитомелаговірусу (картопля, тютюн), вірусу папіломи (картопля). У переважній більшості випадків при поїданні їстівних трансгенних рослин, що продукують ці білки, розвивалась специфічна імунна відповідь. Отримання нових їстівних рослинних вакцин є одним з найбільш перспективних напрямків генної інженерії.

#### ***Питання для контролю:***

1. Які переваги використання трансгенних рослин?
2. Що таке генетична трансформація та які етапи цього процесу?
3. Опишіть підходи генетичної трансформації рослин.
4. Охарактеризуйте генноінженерні методи поліпшення якості рослинних білків.

5. Які існують способи збільшення продуктивності рослин?
6. Поясніть необхідність та наведіть приклади створення стресостійких рослин.
7. Опишіть трансгенні рослини стійкі до комах.
8. Як рослини природно протидіють фітопатогенам?
9. Які існують генноінженерні варіанти підвищення стійкості рослин до фітопатогенів?
10. Поясніть передумови створення трансгенних рослин, стійких до гербіцидів.
11. Опишіть приклади трансгенних рослин, стійких до гербіцидів.
12. Особливості трансгенезу рослин у медичних цілях.

## Лекція № 5. Біотехнологія відтворення тварин

1. Трансплантація ембріонів.
2. Запліднення яйцеклітин *in vitro*.
3. Міжвидові пересадки ембріонів і отримання химерних тварин.
4. Клонування тварин.

① Розробка методу штучного осіменіння сільськогосподарських тварин і його практичне застосування забезпечили великий успіх у галузі поліпшення генетики тварин. Використання цього методу в поєднанні з тривалим зберіганням сперми в замороженому стані відкрило можливість отримання десятків тисяч нащадків від одного плідника за рік. Цей прийом, по суті, вирішує проблему раціонального використання плідників у практиці тваринництва.

Що стосується самок, то традиційні методи розведення тварин дозволяють отримувати від них малу кількість нащадків за все життя. Низький рівень відтворення у самок і відносно тривалий інтервал між поколіннями обмежують генетичний прогрес у тваринництві. Вирішення цієї проблеми вчені вбачають у застосуванні методу трансплантації ембріонів. Суть методу полягає в тому, що генетично видатні самки звільняються від необхідності виношування плоду і вигодовування нащадків. Крім того, їх стимулюють з метою збільшення виходу яйцеклітин, які після запліднення виймають на стадії ранніх зародків і пересаджують менш цінним у генетичному аспекті реципієнтам.

Технологія трансплантації ембріонів включає такі основні ланки, як стимулювання суперовуляції, штучне осіменіння донора, вилучення ембріонів, оцінка їх якості, короткочасне або тривале зберігання і пересадка реципієнтам.

Стимуляція суперовуляції. Самки ссавців народжуються з великою (кілька десятків і навіть сотень тисяч) кількістю статевих клітин. Більшість з них поступово гинуть у результаті атрезії фолікулів. Тільки невелике число примордіальних

фолікулів переходять в антральні під час росту. Проте практично всі фолікули, що ростуть, реагують на гонадотропну стимуляцію, яка викликає їх кінцеве дозрівання. Обробка самок гонадотропінами у фолікулярній чи лютеїновій фазі статевого циклу в поєднанні з індукцією регресії жовтого тіла простагландином  $\text{F}_{2\alpha}$  (ПГ $\text{F}_{2\alpha}$ ) або його аналогами викликає множинну овуляцію або так звану *суперовуляцію*.

Індукцію суперовуляції у самок великої і малої рогатої худоби проводять обробкою сивороткою крові жеребної кобили (СЖК) або гіпофізарними гонадотропінами: фолікулостимулюючим гормоном (ФСГ) окремо чи в поєднанні з лютеїнізуючим гормоном (ЛГ). СЖК вводять одноразово, а гонадотропіни двічі на день протягом декількох діб. Через 2-3 дні після початку обробки тваринам вводять простагландин  $\text{F}_{2\alpha}$  або його аналоги.

У свиней, які є багатоплідними тваринами, велике число ембріонів можна отримати без гормональної обробки. Однак число овуляцій у свиней може бути збільшено після гормональної обробки.

У кобил ще не розроблені надійні методи індукції суперовуляції, проте отримання достатньої кількості ембріонів у них не є проблемою зважаючи на простоту нехірургічного вилучення і повторного отримання ембріонів кожного статевого циклу.

Вилучення ембріонів. День, коли самку штучно осіменяли, називають датою запліднення. У біотехнології його називають день-нуль і від нього починають підрахунок розвитку ембріона *in vivo* до його вилучення.

Можливі три способи вилучення ембріонів: після забою самки, хірургічним і нехірургічним (вимивання) шляхом.

Ембріони ВРХ надходять з яйцепроводу до матки між 4-м і 5-м днем після початку охоти (між 3-м і 4-м днем після овуляції), хоча у суперовулюючих корів незначна частина ембріонів залишається в яйцепровадах до 7-го дня. У зв'язку з тим, що нехірургічне вилучення ембріонів можливо тільки з рогів матки,

ембріони виймають не раніше 5-го дня після початку охоти. Найбільш оптимальні строки для вилучення ембріонів – 6-8-й день після початку охоти, оскільки ранні бластоцисти цього віку найбільш придатні для глибокого заморожування і можуть бути з високою ефективністю пересажені нехірургічним способом. Корову-донора використовують 6-8 разів на рік, виймаючи по 3-6 ембріонів. Хоча при хірургічному вилученні ембріонів у великої рогатої худоби досягнуті відмінні результати, цей метод відносно дорогий та незручний в умовах виробництва.

У вівців і свиней нехірургічне вилучення ембріонів неможливе з огляду на труднощі проходження катетера через шийку в роги матки. Однак хірургічна операція у цих видів тварин відносно проста і нетривала. Доступ до репродуктивного тракту здійснюється лапаротомією по білій лінії живота. Ефективність вилучення ембріонів у вівці близько 80%, а у свині – 95%. Можна робити 3-4 операції на одній тварині.

Зберігання ембріонів. Застосування методу трансплантації ембріонів вимагало розробки ефективних методів їх зберігання в період між вилученням і пересадкою. У виробничих умовах ембріони зазвичай виймають вранці, а пересаджують у кінці дня. Для зберігання ембріонів протягом цього часу використовують фосфатний буфер з деякими модифікаціями при додаванні ембріональної сироватки великої рогатої худоби і при кімнатній температурі або температурі 37°C. Вживання ембріонів певною мірою може бути збільшене їх охолодженням нижче температури тіла. Чутливість ембріонів до охолодження залежить від виду тварини.

Для тривалого зберігання ембріонів необхідно загальмувати їх розвиток і значно знизити або повністю зупинити обмінні процеси. Такий стан ембріонів досягається при температурі -195°C або нижче.

Нині ембріони заморожують методом програмного одноступінчастого заморожування, або ж одномоментним методом (вітрифікація).

Низькотемпературна консервація ембріонів тварин для наступної їх трансплантації має велике практичне значення. Воно дає можливість тривалий час зберігати цінний генетичний матеріал, відпадає необхідність в утриманні великих стад реципієнтів, значно спрощує експорт та імпорт ембріонів. Стає можливим зберігання генофонду рідких і зникаючих порід тварин.

Найважливіший фактор у процесі заморожування ембріонів – швидкість охолодження, яка для багатьох клітин складає 1°C/хв. Однак, оптимальна швидкість охолодження, що забезпечує максимальний рівень виживання значно варіює для ембріонів різних видів тварин.

Великий вплив на життєздатність клітин виявляє і швидкість відтаювання, яка залежить від швидкості заморожування. При швидкому охолодженні рівень виживання вище за умовою швидкого відтаювання, повільне охолодження потребує повільного відтаювання.

Оптимальною стадією для заморожування ембріонів у великої рогатої худоби є рання бластоциста, вівців і кіз – пізня морула чи рання бластоциста, свиней – бластоциста. Краще переносять заморожування свіжі ембріони.

При заморожуванні ембріонів можуть виникати наступні проблеми: утворення кришталіків криги, зневоднення, збільшення концентрації розчинених речовин у клітині (осмотичний шок). Для їх вирішення використовують кріопротектори, які поділяють на дві групи:

- 1) внутрішні – вводять усередину клітини для запобігання утворення криги. Для цього використовують диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь, етанол тощо;
- 2) зовнішні – запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє у середину клітини, а внутрішній кріопротектор виходить повільно, що викликає набухання і пошкодження ембріону. У якості зовнішніх кріопротекторів в основному використовують розчин цукрози і полівінілпіролідон (ПВП).

Пересадка ембріонів. Ефективність пересадки ембріонів у значній мірі визначається синхронністю виникнення охоти у донора і реципієнта. У великої рогатої худоби введення ембріонів в обидва роги матки забезпечує високу ефективність пересадки. Цей прийом успішно використовують для отримання двоєнь.

Нехірургічна пересадка ембріонів розроблена також для кобил. Висока ефективність цієї процедури досягається між 6-м і 8-м днями після овуляції.

У вівців і свиней пересадку ембріонів проводять тільки хірургічним способом. Ембріони пересаджують у яйцепровід або матку в залежності від стадії розвитку. Ембріони вівці, вилучені на 1-4-й день після охоти, пересаджують у яйцепровід, а ембріони більш старшого віку – в матку. Приживаність становить 70-75%.

У свиней приживаність ембріонів не знижується, якщо двоклітинні ембріони виймають з яйцепроводу і пересаджують в матку реципієнта на тій же стадії розвитку. Рекомендується пересаджувати тільки в один ріг матки, оскільки ембріони мігрують і розподіляються в обох рогах матки. Після пересадки 2-5-денних ембріонів приживаність становить 60-70%. Пересадка ембріонів свиней на більш пізніх стадіях розвитку (7-8-денних) супроводжується або відсутністю вагітності, або значним зниженням приживаності.

② Система запліднення *in vitro* може бути використана насамперед як цінний аналітичний інструмент для вивчення біохімічних і фізіологічних факторів, що включаються в процес запліднення. Разом з оволодінням техніки запліднення поза організмом з'явилась реальна можливість для широкого розгортання досліджень з генної та клітинної інженерії тварин.

Запліднення яйцеклітин ссавців *in vitro* включає наступні основні етапи: дозрівання ооцитів, капацитація сперміїв, запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку, зберігання або пересадка.



Дозрівання ооцитів *in vitro*. Відомо, що після виділення ооциту з фолікула і перенесення його на культуральне середовище, як і після виділення ендогенного ЛГ в організмі тварини перед овуляцією, переривається етап мейотичного гальмування, що супроводжується так званім розривом зародкового пухирця.

Хоча більшість ооцитів, вилучених із фолікулів яєчників, поновлюють мейоз і досягають метафази II, їх запліднення часто не забезпечує повноцінного розвитку зародків. Основною причиною цього є неповноцінне дозрівання ооцитів.

У зв'язку з тим, що стероїдні гормони та інші фактори, які виробляються фолікулярними клітинами, впливають на дозрівання ооцитів, було запропоноване їх спільне культивування. Багато процесів всередині фолікула регулюють гонадотропні гормони, тому при культивуванні ооцитів всередині фолікулів або з фолікулярними клітинами гонадотропіни повинні бути обов'язковою складовою частиною середовища.

Капацитація сперматозоїдів. Після еякуляції сперматозоїди не здатні до запліднення яйцеклітини. Вони повинні пройти процес капацитації до того, як набудуть здатності подолати оболонку яйцеклітини. Капацитація зазвичай відбувається всередині жіночих репродуктивних шляхів, хоча цей процес можна індукувати *in vitro* у відповідних умовах культивування.

Під час *капацитації* спочатку видаляється глікопротеїновий шар з поверхневої мембрани сперматозоїда, що в подальшому призводить до реорганізації поверхневого шару клітинної мембрани. У капацитованих сперміїв змінюється рух джгутика з регулярних хвилеподібних на хлистоподібні. Таке биття джгутика сприяє більш ефективному руху сперматозоїдів.

Капацитовані сперматозоїди стають більш чутливі до кальцію і мають більший вміст цАМФ, що необхідно для здійснення акросомної реакції – наступного етапу процесу запліднення.

Розроблено ряд методів капацитації сперміїв домашніх тварин. Для видалення білків з їх поверхні, які гальмують капацитацію сперміїв, було використано середовище з високою іонною силою, що характеризується підвищеною концентрацією хлориду натрію. Після цього спермії відмивають від цього середовища центрифугуванням та інкубують протягом певного часу в ізотонічному середовищі для «докапацитації». Найпопулярнішим є спосіб капацитації сперматозоїдів з використанням гепарину.

Зпліднення *in vitro*. При проведенні дослідів щодо запліднення *in vitro* велике значення має концентрація сперміїв і тривалість спільної інкубації яйцеклітин з ними.

Пенетрація яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них сперміїв за допомогою заточеної мікропіпетки. Основною проблемою при цьому є загибель багатьох яйцеклітин через ушкодження в процесі мікроін'єкції. Однак, цей спосіб запліднення жіночих гамет, при якому капацитація й акросомна реакція сперміїв не є необхідними, дозволяє використовувати для запліднення нерухомі, мертві, дефектні спермії або їх голівки. Є, також, методи мікроманіпуляцій з дозрілими ооцитами тварин, засновані на порушенні цілісності їх прозорої оболонки з наступним перенесенням жіночих гамет у суспензію капацитованих сперміїв. Метод часткового розсічення прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів може бути використаний для подолання незапліднюваності яйцеклітин, поряд з тим може виникнути явище поліспермії.

③ У тварин *химерами* називають організми, які складаються з генетично різних клітин, які походять від двох і більше різних зигот. Химеризм у тварин потрібно відрізнити від мозаїцизму – присутності в одному організмі генетично різнорідних клітин, що походять від однієї зиготи.

Химеризм буває первинний, коли різні клітинні популяції співіснують із моменту запліднення або раннього ембріогенезу, і вторинний, при якому

комбінуються тканини від двох і більше дорослих особин або ембріонів після початку глибокої клітинної диференціації.

Химеризм у тварин може бути як результатом індивідуального розвитку організму (онтогенезу), так і результатом трансплантації органу, тканини (наприклад, кісткового мозку або переливання крові). Химери часто можуть давати нащадків, і їх тип залежить від того, з якої лінії клітин розвивалися гамети.

Усі відомі в науці експериментальні химери ссавців створені методами агрегації двох (або більше) генотипово різнорідних зародків або шляхом мікроін'єкції клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоціль ембріона-реципієнта. Перший метод отримав назву агрегаційний, другий – ін'єкційний.

Агрегаційний метод полягає в тому, що два ембріони, які розрізняються генотипами, на стадії 8-12 бластомерів обробляють протеолітичним ферментом проназою, звільняють від зони пелюциду й зближають один з одним у культуральному середовищі. З'єднані ембріони культивують протягом 1-2 діб до завершення агрегації, тобто до утворення бластоцисти. Отримані таким чином химерні ембріони трансплантують реципієнту. Агрегаційні химери можна одержувати не тільки між двома ембріонами, але й між різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів. Перевага цього методу полягає в тому, що він не вимагає втручання мікрохірургічної техніки, що дозволяє широко його використати в ембріогенетиці.

При ін'єкційному методі використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Її фіксують мікропіпеткою й шляхом проколів голками зони пелюциду у трофобласті роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Пізніше вдалося встановити, що цим методом можна ін'єктувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, але й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують реципієнтові. Ін'єкційний метод знайшов застосування при одержанні міжвидових химер.

④ *Клонування* – в найзагальнішому розумінні – точне відтворення будь-якого об'єкту потрібну кількість разів. Об'єкти, отримані в результаті клонування (кожен окремо і вся їх сукупність) називаються *клоном*.

Природне клонування часто відбувається в результаті нестатевого і вегетативного розмноження, а також в результаті амейотичного партеногенезу.

Найбільшу увагу вчених і громадськості привертає клонування багатоклітинних організмів, яке стало можливим завдяки успіхам генної інженерії. Створюючи особливі умови і втручаючись у структуру ядра клітини, фахівці змушують її розвиватися в потрібну тканину або навіть цілий організм.

Розрізняють повне (репродуктивне) і часткове клонування організмів. При *повному* відтворюється весь організм цілком, при *частковому* – організм не відновлюється в повному обсязі (наприклад, лише ті чи інші його тканини).

Крім наукових цілей репродуктивне клонування може застосовуватися для відновлення померлого організму і навіть зниклих видів, за умови наявності їх генетичного матеріалу, а також для збереження рідкісних видів.

Окрім того, створення тварин із заданими якостями завжди було надзвичайно привабливим. Це дозволяло б створювати організми стійкі до хвороб, кліматичних умов, що дають достатній приплід, необхідну кількість м'яса, молока та інших продуктів. Використання технології клонування дає унікальну можливість отримувати фенотипово і генетично ідентичні організми, які можуть бути використані для вирішення різних теоретичних і прикладних завдань, що стоять перед біомедициною та сільським господарством. Зокрема, використання клонування могло б сприяти вивченню проблеми тотіпотентності диференційованих клітин, розвитку і старіння організмів, злоякісного переродження клітин. Завдяки технології клонування стає можливим прискорення генетичної селекції та тиражування тварин з винятковими виробничими показниками. У поєднанні з трансгенезом клонування тварин

відкриває додаткові можливості для виробництва цінних біологічно активних білків для лікування різних захворювань тварин і людини. Клонування тварин, можливо, дозволить проводити випробування медичних препаратів на ідентичних організмах.

Однак, слід мати на увазі, що точне відтворення тварин як при природному, так і при штучному клонуванні неможливо. Новий організм у будь-якому випадку буде відрізнятися від материнського за рахунок соматичних мутацій, епігенетичних змін спадкового матеріалу, впливу навколишнього середовища на фенотип і випадкових відхилень, що виникають у ході онтогенезу.

#### ***Питання для контролю:***

1. Охарактеризуйте особливості стимуляції суперовуляції та вилучення ембріонів.
2. В чому суть короткочасного і тривалого зберігання ембріонів та які нюанси їх пересадки домашнім тваринам?
3. Які особливості запліднення яйцеклітин *in vitro*.
4. Що таке химерні тварини та як їх отримують?
5. Клонування: поняття, різновиди, цілі, проблеми.

## Лекція № 6. Біотехнологія у ветеринарній медицині

1. *Загальні положення.*
2. *Класифікація вакцин.*
3. *Технологія промислового приготування вакцин.*
4. *Нові напрямки створення вакцин.*

① Перед ветеринарною медициною стоять важливі завдання з розробки та впровадження у виробництво ефективних методів боротьби з найбільш поширеними і небезпечними захворюваннями сільськогосподарських тварин на промислових комплексах та у малих тваринницьких господарствах і забезпечення виробництва безпечної для людини тваринницької продукції.

Розв'язання цих завдань здійснюється як традиційними ветеринарними підходами, так і за допомогою новітніх біотехнологічних методів, що дозволяють з порівняно дешевих, доступних і поновлюваних матеріалів отримати різноманітні речовини і сполуки.

Ветеринарна біотехнологія тісно пов'язана з життєдіяльністю різних груп мікроорганізмів, при цьому мікробіологічні процеси, що здійснюються з їх використанням мають ряд особливостей:

- 1) процес мікробного синтезу, як правило, є частиною багатостадійного виробництва, при цьому продукт біосинтезу не завжди є кінцевою формою і в більшості випадків підлягає подальшій переробці;
- 2) при культивуванні мікроорганізмів необхідно підтримувати асептичні умови, що вимагає стерилізації обладнання, комунікацій, сировини тощо;
- 3) складність біохімічних механізмів регуляції росту мікроорганізмів і біосинтезу продуктів їх метаболізму;

- 4) культивування мікроорганізмів здійснюють у гетерогенних різноманітних системах, фізико-хімічні властивості яких у ході процесу можуть істотно змінюватися;
- 5) автокаталітичний характер процесу, тобто вплив продуктів, які утворюються, і біомаси на швидкість протікання процесу;
- 6) технологічний процес відтворення і накопичення є високо варіабельним через наявність мікроорганізмів на різних стадіях розвитку.

② *Вакцинація* – це один з базових способів боротьби з інфекційними захворюваннями. Шляхом поголівної вакцинації тварин ліквідована натуральна віспа, значно обмежено поширення сказу, ящуру та інших захворювань. Істотне економічне значення має своєчасна розробка вакцин проти хвороб тварин і проведена з їх допомогою профілактика.

*Вакцина* – це препарат, що складається з ослаблених або вбитих збудників хвороб, їх компонентів чи продуктів життєдіяльності, які застосовуються для створення активного імунітету у тварин і людей.

З урахуванням традиційного і сучасного підходів всі вакцини класифікують:

- За спрямованістю застосування на протибактеріальні, протигрибкові, противірусні;
- За здатністю розмножуватись (до реплікації) на живі та інактивовані;
- За сировинними компонентами на корпускулярні, спліт-вакцини, субдиничні і вакцини з екзопродуктів (анатоксини).
- За кількістю типів антигенів на моно-, полівалентні, асоційовані;
- За видовою належністю вакцинного штаму на гомологічні і гетерологічні.
- За способом отримання на генно-інженерні, хімічні та синтетичні.

*Живі (атенуйовані) вакцини* являють собою імунопрофілактичні препарати, які складаються зі спадково змінених форм збудників інфекційних захворювань, суспендованих або висушених у відповідних фізіологічних середовищах. Вони

здатні розмножуватися в організмі і породжувати вакцинальний процес, формуючи імунітет. Втрата вірулентності в таких штаммах закріплена генетично.

Живі вакцини одержують шляхом штучної атенуації (ослаблення штаму) або відбираючи природні авірулентні штами (дивергентна вакцина). Нині можливий шлях створення живих вакцин шляхом генної інженерії, модифікуючи ДНК мікрорганізмів.

До позитивних сторін використання живих вакцин відносяться:

- 1) Викликають досить ефективний клітинний та гуморальний імунітет;
- 2) За механізмом дії на організм подібні «дикому» штаму, витісняючи його;
- 3) Може приживлятися в організмі, довгостроково підтримувати імунітет, а тому зазвичай вимагають лише одного бустерного (повторного) введення.

Разом з тим є негативні сторони використання живих вакцин:

- 1) Важко дозувати і здійснювати біоконтроль;
- 2) Містить до 99% баласту і тому зазвичай досить реактогенна;
- 3) Здатні викликати мутації клітин організму (хромосомні аберації), що особливо небезпечно у відношенні статевих клітин;
- 4) Чутливі до дії високих температур і вимагають неухильного дотримання холодового ланцюгу;
- 5) Можливість реверсії вірулентних форм, що може стати причиною захворювання вакцинованого.

*Інактивовані (неживі) вакцини* – це препарати, які містять інактивовану культуру штамів збудників інфекційних хвороб, які при цьому втратили вірулентність і здатність до репродукції, але зберегли імуногенні властивості. Вони містять або мертвий цілий мікроорганізм, або компоненти клітинної стінки чи інших частин збудника. Їх інактивують фізичними (температура, опромінення) чи хімічними (спирт, формальдегід) методами.

До позитивних сторін інактивованих вакцин відносять:

- 1) Виключена можливість реверсії вірулентності;



- 2) Легше дозувати й очищати;
- 3) Стабільні та довше зберігаються;
- 4) Менш чутливі до температурних коливань і часто не вимагають низькотемпературного збереження.

Негативні сторони:

- 1) Породжують відносну слабку імунну відповідь;
- 2) Корпускулярна вакцина містить до 99% баласту і тому є реактогеною;
- 3) Може містити агент, який використаний для інактивації збудника;
- 4) Інактивованій мікробний штам не приживляється, а тому вакцина передбачає часті ревакцинації;
- 5) Інактивовані вакцини випускають як у сухому (ліофілізованому), так і в рідкому вигляді.

*Корпускулярні вакцини* складаються з мікроорганізмів, які переважно зберегли цілісність своєї будови – бактерійних клітин чи вірусних корпускул. Вони містять у собі повний комплект антигенів для формування імунітету, так би мовити «все включено». Корпускулярні вакцини з цілих бактерій називають *цільноклітинними*, а з цілих вірусів – *цільновіріонними*.

Переваги корпускулярних вакцин: простота отримання; висока стійкість при зберіганні і більша його тривалість. Недоліки: невисока сила і тривалість імунітету; необхідність повторних щеплень; реактогенність.

*Спліт-вакцини* складаються з очищених і зруйнованих бактерій (субклітинні) та вірусів (субвіріонні). Такі вакцини містять антигенні комплекси, виділені зі зруйнованих мікроорганізмів за допомогою детергентів. За рахунок додаткового очищення в такій вакцині менше токсичних субстанцій в порівнянні з будь-якою корпускулярною. Раніше вакцини, отримані таким шляхом, називалися хімічними. Однак цей термін нині більш характерний вакцинам, отриманим методами хімічного синтезу.

Переваги спліт-вакцин: містять лише імунологічно активні частини збудників; менш реактогенні; більш стабільні при зберіганні; легше піддаються стандартизації та більш точному дозуванню; можна вводити у великих дозах і у вигляді асоційованих препаратів. Недоліки: більш ускладнене отримання; слабша імуногенність; малі розміри, що призводить до швидкого виведення і до короткотривалого антигенного подразнення.

*Субодиничні (компонентні) вакцини* – різновид вакцин, які складаються з окремих (головних, або мажорних) антигенних компонентів, здатних забезпечити розвиток імунітету. У якості антигенів застосовують імуногенні компоненти збудника. Для їх виділення використовують різні фізико-хімічні методи, а також методи генетичної інженерії.

*Анатоксини* являють собою бактеріальні екзотоксини, знешкоджені шляхом тривалої обробки розчином формальдегіду в умовах підвищеної температури (+ 37 ° C). Після проведення обробки бактеріальний екзотоксин втрачає токсичність однак зберігає здатність індукувати синтез антитоксичних антитіл. Такий метод дозволяє уникнути реверсії токсичності.

*Моновалентні вакцини* містять антигени одного типу (виду) інфекційного збудника. *Полівалентні (політипові, поліваріантні, поліштамові) вакцини* складаються з декількох типів, варіантів або штамів збудника однієї хвороби. *Асоційовані (комбіновані, комплексні) вакцини* містять антигени декількох збудників різних інфекційних захворювань.

*Гомологічні вакцини* готують з того виду збудника, проти якого передбачається створити імунітет. Більшість вірусних вакцин є гомологічними. Проте, якщо проводять профілактику хвороби, що викликана одним видом мікроорганізму, вакциною, яка виготовлена з іншого виду, що володіє перехресною імуногенністю, то така вакцина називається *гетерологічною*.

*Генно-інженерні вакцини* – це вакцини виготовлені за допомогою технології рекомбінантних ДНК. Суть її полягає в тому, що ділянка гена збудника, який

відповідає за синтез антигену, вбудовують в ДНК клітин-продуцентів, які при розмноженні синтезують даний антиген. Протективний білок отримують шляхом руйнування клітин-продуцентів і очищення фізичними і хімічними методами. Новим підходом до створення вірусних вакцин є введення генів, відповідальних за синтез вірусних білків в геном іншого вірусу. Таким чином, створюються рекомбінантні віруси, які забезпечують комбінований імунітет. Окрім того, за допомогою сайт-специфічного мутагенезу розроблені методи модифікації ДНК інфекційних збудників для блокування (позбавлення) їх вірулентності.

*Синтетичні вакцини* – це препарати, що містять штучно синтезовані короткі пептиди, які імітують невеликі ділянки антигенів збудників, здатні викликати специфічну імунну відповідь організму і захистити його від захворювання. Для отримання таких вакцин використовують автоматичні синтезатори. Однак синтетичні пептиди виявилися слабкими антигенами, і для посилення імуногенності вони потребують поєднання з білком-носієм або синтетичним біополімером. Ще одна проблема, пов'язана з синтетичними пептидами, полягає в тому, що багато антигенних детермінант являють собою конформаційні кислотні ділянки, зібрані разом завдяки просторовій організації білку. Для імунної відповіді конформація є дуже важливою. Циклічні пептиди показали більшу імуногенність, ніж їх лінійні аналоги.

③ Атенуований штам певного мікроорганізму в умовах біопідприємств адаптують до виробничих живильних середовищ. Потім його вирощують, як правило, глибинним способом в реакторах і після отримання бактеріальної культури центрифугують для отримання концентрату біомаси. Рідка частина (культуральна рідина) видалається. Для того щоб бактеріальна маса була рівномірної концентрації, проводять суспендування у гомогенізаторі протягом визначеного для кожного препарату часу. Отриману концентровану бактеріальну масу з'єднують в певних співвідношеннях із захисним

середовищем, розливають у флакони або ампули і піддають ліофільної сушці. Після цього ампули запаюють, а флакони закривають гумовими пробками з нейтрального матеріалу і герметизують. Після етикетування приготовлені серії вакцин здають на контроль.

Більшість живих вакцин випускаються в сухому вигляді. По суті це культура атенуєваних штамів, відстандартизованих шляхом сепарування і суспендування до необхідної концентрації, яку фасують у флакони ємністю 50-100-200 мл і здають на контроль.

Інактивовані вакцини готують з високовірулентних штамів відповідного виду мікробів. Тому отриману з нього нативну культуру необхідно знешкодити (інактивувати). Способи інактивації бувають різними. Вони повинні бути помірними щоб не порушити імуногенності препарату.

Найчастіше культури мікробів інактивують (вбивають) хімічними речовинами – ефіром, фенолом, формаліном, спиртом, ацетоном та ін. Кращим є формалін, оскільки він здатний не тільки вбивати мікробну клітину, а й інактивувати мікробні токсини, перетворюючи їх на анатоксин.

Інактивацію культури мікроорганізмів зазначеним способом здійснюють шляхом додавання до неї формаліну з вмістом формальдегіду 36% і витримки її при 37°C протягом декількох годин або діб. Більшість формалізованих вакцин є концентрованими. Бактеріальну масу, що виросла, концентрують з використанням сепараторів. Осаджену бактеріальну масу вивантажують в гомогенізатор, де її стандартизують шляхом розбавлення формалінованим фізіологічним розчином до необхідної концентрації, і потім змішують з ад'ювантом, який одночасно є і сорбентом мікробних клітин. У якості сорбентів найбільш часто використовують гідроксид алюмінію (ГОА), алюмокалієві квасці, оліеланолінову суміш тощо.

Необхідність використання зазначених депонентів полягає в тому, що високоочищений концентрований препарат, введений в організм без депоненту,

швидко виводиться з нього, не забезпечуючи належної імунологічної відповіді. Антиген, введений разом з депонентом, затримується на місці введення (в депо), що забезпечує створення імунітету більшою напруженості і тривалості.

Після з'єднання бактеріальної маси з ад'ювантом вакцину фасують у флакони, закривають їх пробками з нейтральної гуми і для герметичності обкатують алюмінієвими ковпачками. На флакони наносять етикетки із зазначенням біофабрики-виробника, назви препарату, способу його застосування і дозування. Після цього препарат здають на контроль.

④ Сучасні біотехнологічні розробки передбачають створення численних варіантів вакцинних препаратів. Найбільший інтерес і цінність мають векторні, ДНК- і біосинтетичні вакцини, які створюються генно-інженерними методиками. Отримання таких вакцин – перспективний напрямок сучасної біотехнології і вакцинології.

*Векторні вакцини* – це модифіковані непатогенні мікроорганізми з рекомбінантною ДНК, що містить гени збудників певних захворювань. Суть методу полягає в тому, що гени вірулентного мікроорганізму, відповідальні за синтез антигенів, вбудовують у геном непатогенного мікроорганізму, що при культивуванні продукує і накопичує відповідний антиген. У якості векторів використовують бакуловіруси, атенуйовані віруси натуральної віспи, аденовіруси. У векторних вакцинах можуть експресуватись окремі антигени або комбінації імунодомінантних протективних антигенів збудників інфекційних захворювань.

Для отримання векторних вакцин часто використовують вірус коров'ячої віспи (вірус вісповакцини – ВВВ). У його ДНК вбудовують чужорідні гени, які кодують імуногенні білки різних збудників: гемаглютинін вірусу грипу, глікопротеїн D вірусу герпесу, поверхневий антиген вірусу гепатиту В, антиген малярійного плазмодію тощо. Нарешті, маються позитивні результати

використання так званих векторних вакцин, коли на носій – живий рекомбінантний поксвірус (вектор) наносяться поверхневі білки двох вірусів: глікопротеїн D вірусу простого герпеса і гемаглютинін вірусу грипу А. Відбувається необмежена реплікація вектора і розвивається адекватна імунна відповідь проти вірусної інфекції обох типів.

До переваг таких вакцин відноситься можливість створення полівалентних препаратів на основі об'єднання ділянок ДНК різних патогенів «під егідою» ДНК вірусу. Відкривається можливість одномоментної комплексної імунізації тварин проти всіх небезпечних інфекцій певної місцевості.

*ДНК-вакцина (генна вакцина)* – генно-інженерна конструкція, яка після введення в клітину забезпечує продукування білків патогенів або пухлинних антигенів та викликає імунну реакцію. Введення ДНК-вакцин в організм називають генетичною імунізацією. ДНК-вакцинація має низку переваг у порівнянні зі звичайними вакцинами. Зокрема показано, що такі вакцини забезпечують не лише вироблення антитіл (гуморальний імунітет), а й специфічну цитотоксичну відповідь (клітинний імунітет), що раніше було досяжним лише з використанням живих вакцин.

За структурою ДНК-вакцина – це вбудована у вектор нуклеотидна послідовність, що кодує певний антиген чи антигени. Традиційно для транспортування генів в клітину застосовували вектори на основі вірусів. Вірусні вектори є достатньо ефективними, проте мають суттєву ймовірність розвитку побічних ефектів, пов'язану з відносно високою імуногенністю самого вектора. Тому на сьогодні як вектор перспективніше використовувати бактеріальну плазмідну – невелику стабільну кільцеву молекулу ДНК, здатну до автономної реплікації. Сама по собі плазмідна не викликає потрібної специфічної імунної відповіді, для цього в неї вшивають гени імуногенних білків. Також ДНК-вакцина повинна містити регуляторні послідовності, необхідні для експресії генів в клітинах еукаріот. Готову ДНК-конструкцію доставляють у бактеріальну клітину,

де нарощується кількість її копій. Після цього проводять виділення й очищення плазмід, які несуть потрібну вставку.

*Босинтетичні вакцини (вакцини-антигени)* – це вакцини, отримані методами генної інженерії, які є штучно створеними антигенними детермінантами мікроорганізмів. Для її створення, вносять генетичний матеріал збудника хвороби у складі рекомбінантної ДНК до клітин кишкової палички, дріжджів, клітин комах і ссавців, які в подальшому продукують антиген цього збудника. Після культивування клітин-реципієнтів з них виділяють потрібний антиген, очищають і готують вакцину. На сьогодні клонований ген поверхневого антигену HBS-вірусу гепатиту (сироваткового гепатиту), ген білка оболонки VP1 – вірусу ящура. Останній існує у вигляді багатьох серотипів. Методом білкової інженерії вдалося скомбінувати імуногенні компоненти різних серотипів у межах однієї біосинтетичної вакцини.

Босинтетичні вакцини високостабільні при зберіганні та перевезенні, порівняно прості у використанні (у тому числі і при великомасштабному виробництві), містять мінімальну кількість білка і тому відносно безпечні як потенційні алергени. Вони позбавлені залишкової вірулентності – здатності викликати інфекційну хворобу замість того. На жаль, поки залишається проблема низької імуногенності босинтетичних вакцин. Однією з причин цього може бути те, що вакцина не включає всіх компонентів збудника, необхідних для створення до нього імунітету. Підвищенню імуногенності босинтетичних вакцин сприяє додавання ад'ювантів, іммобілізація вакцин на носіях або їх включення в ліпосоми.

Вірусні білки, синтезовані в бактеріальній системі, поступаються за імуногенністю і за виходом продуктів еукаріотичного синтезу, що пов'язують з їх вторинною, третинною і четвертинною структурами.

У багатьох вірусів антигенні детермінанти, які викликають появу антитіл, розташовані в ділянках білку, первинна структура яких є високоваріабельною.

Тому вакцина, приготована проти одного серотипу вірусу, погано захищає від вірусу цього ж виду, але з іншим серотипом. Однак при імунізації тварин ділянками, ізольованими з консервативної зони поліпептиду, в організмі утворюються антитіла проти цих низькомінливих ділянок білка. Такий підхід може бути використаний при створенні вакцин широкого спектру дії.

Варто відмітити, що рекомбінантні ДНК можуть бути широко використані для виявлення збудників методом молекулярної гібридизації. Цей метод дозволяє швидко і точно діагностувати інфекційні хвороби. Він може використовуватися для пренатального діагнозу генетичних дефектів, виявлення тварин-носіїв збудника, прихованих та повільних інфекцій. Метод заснований на використанні зондів ДНК, мічених радіоактивними сполуками або біочіпами, з подальшою гібридизацією зондів зі зразками тканин тварини – гіпотетичного носія збудника хвороби.

#### ***Питання для контролю:***

1. Зазначте особливості мікробіологічних процесів, що характерні для ветеринарної біотехнології.
2. Охарактеризуйте вакцини за здатністю до відтворення.
3. Опишіть різновиди вакцин за сировинними компонентами.
4. Надайте характеристику різновидам вакцин за кількістю типів антигенів і видовою належністю вакцинного штаму.
5. Що таке синтетичні і генноінженерні вакцини та які їх особливості?
6. Технологія промислового приготування живих вакцин.
7. Технологія промислового приготування інактивованих вакцин.
8. Опишіть векторні вакцини.
9. Що таке ДНК-вакцина?
10. Охарактеризуйте біосинтетичні вакцини.



## Лекція № 7. Методи отримання трансгенних тварин

1. *Стан та перспективи трансгенезу тварин.*
2. *Пересадка гену з використанням ретровірусу.*
3. *Мікроін'єкція генів.*
4. *Пересадка трансгенних клітин в еноклейовані яйцеклітини.*
5. *Пересадка гену шляхом введення його в сперму.*

① Успіхи в технології отримання рекомбінантних ДНК відкрили можливість отримання нових корисних властивостей у тварини вже в першому поколінні, а також створення нових генотипів шляхом введення та/або видалення послідовностей нуклеотидів або інших змін геному.

Вже наявні результати з отримання трансгенних тварин говорять про можливість зміни ряду найважливіших господарсько-цінних ознак. Наприклад, трансгенні тварини (свині, кури, кролики) з геном гормону росту при рівних умовах характеризуються підвищеними темпами росту.

Іншим важливим напрямом генної інженерії є одержання трансгенних особин з інтегрованими в геном генними конструкціями, пов'язаними з посиленням імунітету тварин до інфекційних захворювань.

Третім актуальним напрямком генної інженерії тварин є отримання продуцентів біологічно активних речовин (БАР), необхідних у медицині, ветеринарії та технології переробки продуктів тваринництва. Оскільки багато БАР не можуть створюватись традиційними методами в достатніх кількостях і з бажаною якістю.

Першим прикладом трансгенної тварини стала миша, яка за розмірами вдвічі переважала звичайних особин, оскільки в неї був введений ген, що синтезує гормон росту пацюка. І вчених відразу зацікавила можливість трансгенезу у сільськогосподарських тварин.

Напрямок, пов'язаний з отриманням від трансгенних тварин людських білків, вже наближається до стадії комерціалізації. Вчені небезуспішно намагаються синтезувати людські білки в бактеріях і дріжджах, але часто це дорого і технічно складно. До того ж деякі білки неможливо отримати в бактеріях через громіздкість генів, що визначають їх синтез. Біореактор у вигляді корови або вівці позбавлений цих недоліків, і він набагато продуктивніший, а кінцевий продукт (білок) є в десятки разів дешевше. Але почалося все знову ж таки з миші.

У 1987 році в США вивели трансгенних мишей, в молоці яких містився тканинний плазміногенний активатор, що сприяє розсмоктуванню тромбів в людських судинах. Після цього такий напрямок зацікавив великий капітал.

За неповні десять років, що минули з американського досягнення, від трансгенних кіз, вівців, свиней, кролів і навіть корів було отримано сімнадцять лікарських білків. Причому десять з цих білків виділялися з молоком в пристойній концентрації – близько одного грама на літр молока. Це велика кількість, оскільки для курсу лікування деяких хвороб потрібно всього кілька міліграмів. А зараз таким способом навчилися синтезувати набагато більше білків.

② Одним з перших лабораторних прийомів пересадки гена у ссавців була пересадка за допомогою вірусу. Суть методу полягає в зараженні ембріонів перед імплантацією рекомбінантними ретровірусами.

*Ретровіруси* – родина еукаріотичних вірусів, які містять дві копії геномної одноланцюгової РНК довжиною 5-10 тисяч пар нуклеотидів у формі рибонуклеопротейнів. Ретровіруси достатньо інфекційні по відношенню до клітин (майже 100% зараження), а ДНК-копія ретровірусного генома точно визначеним чином інтегрується в ДНК клітини-мішені. Така інтегрована форма існування вірусного геному і ДНК клітини-господаря отримала назву *провірусу*. Клітини, в які потрапили поряд із вірусом чужорідні гени, здатні здійснювати їх

експресію. Ендогенні ретровіруси є одним з різновидів ретроелементів, що складають до 10% геному ссавців.

Для зараження ембріональних клітин рекомбінантним ретровірусом, у культуральну рідину з інфікованими фібробластами поміщають восьмиклітинну морулу, позбавлену оболонки, яка інфікується. Інфекція починається із взаємодії ретровірусу з клітинною мембраною і зв'язування поверхневого білка ретровірусу зі специфічним білком-рецептором. Проникнення ретровірусу в клітину відбувається за допомогою мікропіноцитоза. При цьому геном вірусу після проникнення у клітину під впливом ревертази перетворюється на лінійну дволанцюгову ДНК. Якщо транскрипція має місце в цитоплазмі клітини, то дволанцюгова ДНК вірусу транспортується в ядро, де відбувається її циркуляція з подальшою інтеграцією однієї або декількох копій у геном клітини. Інтегрована лінійна ДНК-копія ретровірусного геному (провірус) містить на обох кінцях довгі нуклеотидні повтори – LTR (від англ. long terminal repeats). До складу 5'-LTR входить промотор, з якого починається транскрипція генів інтегрованого провірусу; 3'-LTR – сайт поліаденілювання, де здійснюється термінація РНК-транскриптів.

Ембріон після досягнення стадії бластоцисти вводять у матку псевдовагітної самки. Частина бластоцист може загинути, а частина нормально розвивається і у певні строки трансформується у трансгенних нащадків, які потім підлягають ретельному генетичному аналізу і можуть бути використані для створення трансгенних ліній.

Цей метод був успішно адаптований для різних видів тварин: кури, миші, а пізніше ця процедура була використана і на великій рогатій худобі.

Незважаючи на високу ефективність інтеграції гену за допомогою використання ретровірусу цей прийом має і значні недоліки.

- 1) Відносно невелика кількість генетичної інформації (<10 kb), яка може бути перенесена. Через що трансген може бути позбавленим регуляторних

послідовностей, необхідних для його експресії. Це створює проблему низької експресії гена, що обмежує практичне використання цього прийому.

- 2) Незважаючи на те, що введення вірусних часточок до клітин ембріону вимагає мінімум складних маніпуляцій, упаковка трансгенів у вірус ускладнюється технікою виготовлення генної конструкції та введенням її в геном ретровірусу.
- 3) Хоча ретровірусні вектори створюються не здатними до реплікації, зберігається ймовірність виникненням рекомбінантних явищ між вірусними векторами і ендогенними ретровірусами, в наслідок чого можливе створення нових патогенних агентів, зокрема онкогенів. Це є неприпустимим, якщо цих тварин передбачається використовувати в їжу або як інструмент для одержання комерційного продукту.

Оскільки існують альтернативні методи трансгенезу, ретровірусні вектори рідко використовуються для створення трансгенних тварин, що мають комерційну цінність.

③ Отримання трансгенних тварин шляхом мікроін'єкції гену передбачає наступні етапи:

- 1) збільшення кількості яйцеклітин, необхідних для мікроін'єкції, через стимуляцію суперовуляції гормональною обробкою;
- 2) запліднення відповідних самок спермою самців,
- 3) вилучення ембріонів на стадії пронуклеуса промиванням яйцепроводів після забою донорів або під дією наркозу хірургічним шляхом;
- 4) мікроін'єкції ДНК у запліднені яйцеклітини (зиготи), як правило, відразу після виділення.

У зиготі генетичний матеріал, отриманий від батька і матері, перебуває, відповідно, у чоловічому і жіночому пронуклеосах. Для здійснення мікроін'єкції ДНК, у разі потреби, одноклітинний ембріон за допомогою зниженого тиску

фіксують та утримують піпеткою так, щоб пронуклеус, куди планується ін'єкція, був добре видимим. Кінчик ін'єкційної піпетки (внутрішній діаметр близько 1 мкм) наповнюють розчином ДНК. Піпетку вводять у пронуклеус через прозору оболонку і клітинну мембрану, після чого ін'єктують 2 пкл розчину ДНК. Візуальне збільшення об'єму ядра свідчить про те, що ДНК потрапило у пронуклеус. Після ін'єкції ембріони звільняють від фіксуючої піпетки і культивують до пересадки реципієнтам.

Після декількох годин культивування *in vitro* ембріони трансплантують в яйцепровід синхронізованих реципієнтів. Виняток становить велика рогата худоба, оскільки корові пересаджують ембріони тільки після тривалого культивування (7-8 днів), на більш пізній стадії їх розвитку, оскільки вони на ранніх стадіях розвитку не приживляються після пересадки.

Коровам і кобилам ембріони вводять нехірургічним методом. Кожному реципієнту миші, кролика і свині пересаджують 20-30 ін'єктованих зигот, причому у свиней всі ембріони трансплантують в один яйцепровід, а у мишей і кроликів – в обидва. У вівців, кіз і великої рогатої худоби кожному реципієнту пересаджують два-чотири ембріона.

Тварин, що народилися з ін'єктованих ембріонів, індивідуально мітять, беруть у них проби тканин або крові для перевірки інтеграції ДНК. За допомогою ПЛР-діагностики, дот-, блот-гібридизації за Саузерном.

При використанні методу мікроін'єкції ступінь інтеграції, тобто число трансгенних тварин від загальної кількості народжених тварин, коливається в незначних межах залежно від виду тварин. Так, у мишей цей показник у середньому становить 15%, у свиней – 10-15%, у кролів – 10%, у вівців, кіз й корів – 5-10%. Найбільш важливим, з погляду витрат, що вимагаються для одержання однієї трансгенної тварини, є показник загальної ефективності трансгенезу, що розраховується як відношення числа отриманих трансгенних тварин до загального числа пересаджених ембріонів, вираженого у відсотках.

Величина цього показника також відносно постійна й становить у середньому для мишей – 2%, кролів – 1%, вівців і кіз – 0,5-1%, свиней і корів – 0,5%. Слід зазначити, що на частоту інтеграції при використанні методу мікроін'єкції впливають такі фактори, як ступінь очищення ін'єкційного розчину, форма й концентрація ДНК, склад буферного розчину для мікроін'єкції, якість ембріонів, а також спосіб пересадження ембріонів реципієнтам.

④ Ще одним способом отримання трансгенних ссавців є використання трансформованих генними конструкціями клітинних ліній. З цією метою можуть бути використані як стовбурові клітинні лінії, так і соматичні клітини, культивовані *in vitro*.

На відміну від мікроін'єкції гену в пронуклеус зиготи, метод пересадки трансформованих клітин у без'ядерні яйцеклітини спочатку передбачає внесення гену в соматичні клітини шляхом трансфекції під час їх культивування. При цьому в якості соматичних клітин використовують фетальні фібробласти, генетично модифіковані різними методами (ліпофекція, електропарація та ін.). Модифіковані фетальні фібробласти підсаджують до без'ядерного ооциту і з'єднують їх з цитоплазмою, як правило, електрозлиттям.

Реконструйовані ооцити, розпочинаючи ембріональний розвиток, трансплантують реципієнтам. Таким чином здійснюється клонування тварин шляхом пересадки не звичайної, а генетично трансформованої соматичної клітини в еноклейовану яйцеклітину.

Відносно висока ефективність отримання трансгенних тварин цим методом досягається тим, що реципієнтам трансплантують тільки трансгенні ембріони. Це досягається тим, що відбувається селекція генетично модифікованих клітин, які потім і підсаджують до еноклейованих ооцитів.

Таким чином, використання методу клонування ембріонів для отримання трансгенних тварин істотно скорочує час і вартість процедури. Окрім того, цей

прийом дозволяє отримувати лише самок вже в першому поколінні, оскільки існуючі генетичні методи дозволяють відібрати тільки плоди самок для отримання фетальних фібробластів. У результаті не потрібно витратити додатковий час на процес розведення вихідних лактуючих трансгенних тварин.

З використанням методу пересадки ядер стадо, наприклад з 5-10 трансгенних корів, що є достатнім для забезпечення потреби фармацевтичного ринку в лікарському препараті, може бути створено вже в першому поколінні, тоді як при ін'єкції гена знадобилося б як мінімум два покоління щоб отримати продуктивне стадо.

Використовуючи технологію одержання клонованих птахів шляхом вилучення зародкових клітин з ембріонів на стадії до 6 днів і їх пересадка у ранні ембріони, стало можливим створення трансгенних птахів. Такий ефект досягається тим, що ген вводять в зародкові клітини донора шляхом звичайної трансфекції в культурі клітин, як це робиться на ссавцях. Трансфектовані зародкові клітини знову пересаджують у зародок реципієнта, який продовжує розвиватися до вилуплення. Таким чином отримують курей, які продукують з яйцем різні лікарські білки. Продуктивна група трансгенних курей може бути створена через 12-18 міс, а лікарський білок з яйцем ще через 6-7 міс після перенесення гена.

Проте в даний час найбільше поширення для отримання трансгенних тварин отримали ембріональні стовбурові клітини (ЕСК). *ЕС-клітини* – це нащадки клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти. Їх отримують наступним шляхом: бластоцисти культивуються на підкладці з фібробластів, осідають на дно чашки Петрі й розшаровуються. Клітини ВКМ декілька разів пересівають, і деякі з них дають початок лінії ЕСК. Ці клітини є *поліпотентними* (*плюрипотентними*), тобто в культурі вони можуть диференціюватися в клітини всіх трьох зародкових листків. В ЕСК не було виявлено хромосомних аберацій і вони зберігали нормальний генотип соматичних клітин.

Перевагою отримання трансгенних тварин за допомогою трансформованих стовбурових клітин є можливість визначення статі, а також тестування інтеграції трансгена в культурі клітин. Це означає, що кожен ембріон, який розвивався в культурі після пересадки ядер, буде трансгенним і подальша селекція таких ембріонів не потрібна. Крім того, пересадка таких ембріонів реципієнтам призведе до народження тільки трансгенних нащадків. Використання для одержання трансгенних тварин трансформованих ЕСК робить можливим у ряді випадків проводити оцінку експресії трансгенів, що має важливе значення. При мікроін'єкції трансгени навмання інтегруються в будь-яку частину геному. Це означає, що вони можуть руйнувати важливі гени, в межах яких і відбувається інсерція, або розташовуватися в тих частинах хромосоми, які недоступні для транскрипції. Тестування експресії трансгену в культурі дає можливість отримати трансгенних тварин тільки тих клітинних ліній, у яких трансгени є транскрипційно і трансляційно активними.

⑤ Як природний вектор, що доставляє ДНК у клітини, можуть бути використані спермії. Ще в 1971 році була показана можливість переносу ДНК вірусу *SV40* у яйцеклітини кролів після штучного запліднення спермою, яка попередньо інкубувалася із ДНК. Дослідження показали, що при застосуванні методу переносу ДНК за допомогою сперматозоїдів в одній лабораторії навіть при використанні однакової схеми досліджень можуть бути отримані суперечливі результати. Це дозволяє припустити, що вбудовування ДНК відбувається тільки на певній стадії клітинного циклу.

Досліджували також здатність сперматозоїдів поглинати лінійну ДНК *in vitro* і *in vivo*. Присутність чужорідної ДНК було показано в 60-70% сперматозоїдів. Позитивний сигнал був виявлений у ядрі сперміїв і не зникав при обробці ДНКазою. Таким чином, було показано, що сперматозоїди як *in vitro*, так і *in vivo*



здатні поглинати ДНК і акумулювати її в ядрі, а також те, що секрети придатків і сім'яних каналців не блокують цей процес.

Для підвищення ефективності зв'язування ДНК зі сперматозоїдами використовують різні методи: ДНК-ліпосомні комплекси, ін'єкцію в сім'яники, безпосередню ін'єкцію в сім'яні каналці й придатки, ін'єкцію в сім'яні каналці з наступної електропорацією тощо.

Використання сперміїв у якості носіїв для трансгену можливо здатне забезпечити інтродукцію їх у геном зародку в найбільш оптимальний для цього період. Однак, це залежить від місця, в яке потрапляє чужорідна ДНК. Встановлено, що для бугаїв і кнурів здатність до зв'язування трансгену обмежена головним чином екваторіальною зоною і постакросомальним районом голівки сперматозоїду. До того ж спермії мають спонтанну тенденцію до зв'язування трансгену, що присутній в культуральному середовищі. Експерименти показали, що з'єднання чужорідної ДНК і її проникнення в голівку спермія можливо лише в тому випадку, коли сім'яна плазма ретельно видалена.

Було встановлено, що перенесення трансгенів за допомогою сперміїв у геном зиготи може здійснюватися не лише в умовах *in vitro*, але і при заплідненні *in vivo*. При цьому відмиті від сім'яної плазми сперматозоїди кнура утримували в культуральному середовищі з плазмідною, яка містила трансген, протягом 30 хвилин, після чого оброблені спермії центрифугували до об'єму 1 мл і вносили в кожен ріг матки за допомогою ін'єкції по 0,5 мл трансформованих сперміїв. Відсоток запліднення свиноматок склав 73 (16 свиноматок з 22), і 10 з 48 (21%) поросят виявилися трансгенними.

Використання сперматозоїдів у якості носіїв трансгену при заплідненні *in vivo* значно спрощує технологію отримання трансгенних тварин і може значно збільшити частоту інтеграції чужорідних генів.

***Питання для контролю:***

1. Які існують напрямки трансгенезу тварин?
2. Суть, переваги і недоліки трансгенезу тварин з використанням ретровірусу.
3. Як здійснюють генетичну трансформацію тварин за допомогою мікроін'єкції генів?
4. Опишіть трансгенез тварин шляхом пересадки генетично-модифікованих соматичних клітин до яйцеклітин.
5. Як отримують трансгенних тварин з використанням ембріональних стовбурових клітин?
6. Як використовують спермії для переносу трансгену?

## Лекція № 8. Виробництво кормових білків

1. *Особливості виробництва білка мікроорганізмами.*
2. *Мікроорганізми – продуценти білка.*
3. *Загальна технологія одержання мікробного білка.*

① Однією із першочергових проблем тваринництва є проблема нестачі білка, яка потребує якнайшвидшого вирішення. Якщо нестачу ліпідів і вуглеводів у раціоні можна певною мірою компенсувати білками, то ні в людини, ні у тварини немає біологічних механізмів зменшення потреби в білку, або його заміни. За нестачі білка знижується працездатність і резистентність людини, а дефіцит білка в раціоні тварини не дає змогу реалізувати генетичний потенціал продуктивності і забезпечити на належному рівні стан здоров'я та їх відтворювальну здатність. Проблема поглиблюється тим, що потреба тварин у білку збільшується при підвищенні рівня продуктивності і при багатьох захворюваннях, а також у стресових ситуаціях.

Всередині ХХ століття стало очевидним, що задовольнити зростаючу потребу людей і свійських тварин у білках традиційними шляхами нереально. Наприклад, у 1982 р. потреби тваринництва в білку задовольнялись лише на 70-75 %. Дефіцит кормового білка зумовлює зниження продуктивності тварин на 30-35 %, підвищення собівартості тваринницької продукції і витрати кормів – приблизно у півтора рази. Однак проблема не зводиться тільки до одержання з раціоном певної кількості білка. Необхідно, щоб у ньому була достатня кількість незамінних амінокислот у певному співвідношенні.

Традиційно основним джерелом білка у раціоні тварин є зерна злакових культур, але в них мало білка і він є неповноцінним за вмістом незамінних амінокислот. Джерелом повноцінного білка є корми тваринного походження – борошно м'ясне, м'ясокісткове, рибне, молоко і відходи його переробки. Але ці

корми дефіцитні і мають високу вартість. Найбільш поширеним у світі способом балансування раціонів за білком є добавка до них соєвого борошна, білок якого за своєю біологічною повноцінністю наближається до кормів тваринного походження. Але вирощування цієї культури трудомістке, врожаї ще досить низькі, а звідси висока її вартість.

Альтернативним соєвому є білок, одержаний мікробіологічним шляхом. Вперше вислів «білки одноклітинних організмів» (БОО) використали в 60-ті роки ХХ ст. по відношенню до мікробних білків, які продукуються масовими культурами дріжджів або бактерій, що використовуються у харчуванні людей або годівлі тварин. Перевагою біотехнологічного виробництва білка є те, що воно не залежить від погодних і кліматичних умов, не потребує посівних площ, є високоінтенсивним і піддається автоматизації.

Мікроорганізми – продуценти білків відзначаються дуже високою інтенсивністю накопичення біомаси, яка в 500-5000 разів вище, ніж у рослин або тварин. Мікробні клітини здатні накопичувати дуже великі кількості білка (дріжджі – до 60 %, бактерії – до 75 % маси). Коливання вмісту білка у сухій речовині біомаси мікроорганізмів може складати від 19 до 90 %. У мікробіологічному виробництві за рахунок високої специфічності мікроорганізмів відсутня багатостадійність, а сам процес біосинтезу відбувається у м'яких умовах при температурі 30-45°C, рН 3-6 і тиску ~ 0,1 МПа.

Білок одноклітинних містить усі (10) незамінні амінокислоти, переважно багатий на лізин, який визначає його біологічну повноцінність. Додавання біомаси одноклітинних до дефіцитних за лізином рослинних кормів дає можливість наблизити їх амінокислотний склад до оптимального. Недоліком біомаси одноклітинних є дефіцит сірковмісних амінокислот, в першу чергу метіоніну, якого приблизно удвічі менше, ніж у рибному борошні. Однак цей недолік має і білок сої.

Багата білками біомаса одноклітинних з високою ефективністю засвоюється сільськогосподарськими тваринами. Так, 1 т кормових дріжджів дає можливість

одержати 0,4–0,6 т свинини, до 1,5 т м'яса птахів, 25–30 тис. яєць і заощадити 5–7 т зерна. Це має велике народногосподарське значення, оскільки майже 80 % площ сільськогосподарських угідь у світі відведено для виробництва кормів.

Шляхом селекції можна відібрати найбільш продуктивні штами мікроорганізмів, які здатні ефективно використовувати нові джерела сировини. Широкі можливості дають біотехнології рекомбінантних ДНК, завдяки яким можливо удосконалювати або одержувати нові продуценти. Усі ці переваги і визначили швидкий розвиток технології одержання мікробного білка, яка є найбільш великотонажною галуззю біотехнології.

② У якості продуцентів для одержання білка найчастіше використовують дріжджі, бактерії, мікроскопічні гриби, одноклітинні водорості.

Дріжджі є дуже перспективними продуцентами білка. Для одержання кормової білкової біомаси використовують різні раси дріжджів, але найчастіше – культури родів *Candidia*, *Torulopsis* і *Saccharomyces*. У процесі виробництва вони швидко адаптуються до токсичних та інгібуючих речовин. Добре ростуть при рН 4,2–4,4.

При виробництві дріжджів використовується легкодоступна і дешева сировина. Традиційними для культивування дріжджів є вуглецеві субстрати (меляса, гідролізати деревини, молочна сироватка, відходи крохмального виробництва і сільського господарства). Нетрадиційна сировина – дистиляти нафти, n-алкани, синтетичний етанол і метанол тощо.

Дріжджі як продуценти білка мають низку переваг: спосіб їх культивування в промислових умовах достатньо відпрацьований; клітини дріжджів більші за клітини бактерій, що полегшує сепарацію; поживна цінність і гігієнічні якості біомаси добре вивчені.

Кількість білка коливається від 40 до 60 % від сухої речовини біомаси. За якістю білка дріжджі прирівнюються до білків тваринного походження. Так,

кормові дріжджі містять у 5 разів більше білка, ніж ячмінь (в тому числі лізину – в 10, метіоніну – у 5 разів і триптофану – утричі).

Особливу цінність кормовим дріжджам надає наявність в них комплексу вітамінів групи В, які беруть участь в розщепленні вуглеводів з виділенням енергії. За вмістом цих вітамінів дріжджі перевершують усі протеїнові корми рослинного і тваринного походження.

Дріжджі мають і деякі недоліки. Білок дріжджів бідний на сірковмісні амінокислоти (вміст метіоніну удвічі-тричі менший, ніж у м'ясному білку) і містить порівняно велику кількість (3-6 %) нуклеїнових кислот. Клітини дріжджів мають міцну оболонку, що ускладнює доступ травних ферментів до поживних речовин клітин і їх потрібно дезінтегрувати (руйнувати).

Непатогенні бактерії. Бактерії як продуценти білка привертають увагу великою швидкістю росту: вони ростуть у середньому в 4 рази швидше дріжджів і майже в 30 разів швидше водоростей. Перевагою також є більш високий вміст білка порівняно з іншими мікроорганізмами – 60-83 % від сухої речовини, а також амінокислот метіоніну і цистину порівняно з дріжджами. Стінки клітин бактерій легше руйнуються.

До основних недоліків бактерій можна зарахувати високий рівень в білку нуклеїнових кислот (до 25 %), наявність в клітинах низки потенційно шкідливих компонентів (циклопропанові і мультирозгалужені жирні кислоти, полі- $\beta$ -оксималяна кислота,  $\alpha$ -амінокислоти тощо); більш низький коефіцієнт виходу біомаси і порівняно складний процес її виділення з культурального середовища через малий розмір клітин.

Плісняві гриби невибагливі до умов культивування і ростуть у різних умовах кислотності, температури і осмотичного тиску. Відмінною особливістю мікроскопічних грибів є їх здатність синтезувати комплекс гідролітичних ферментів, які можуть утилізувати складні поліцукри і лігнін, що є малодоступними для інших мікроорганізмів. Це створює можливість прямої

трансформації в білок целюлозо- і крохмалевмісних субстратів (відходи сільського і лісового господарств та деяких галузей харчової промисловості).

Як продуценти білка, амінокислот, вітамінів та інших біологічно активних речовин використовують гриби родів *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* тощо.

Грибний білковий продукт має низку переваг: він містить ароматичні речовини, які надають йому приємного запаху; нитчаста природа грибного білка забезпечує відносно легке відокремлення біомаси під час промислового виробництва; амінокислотний склад відзначається більш високим рівнем сірковмісних амінокислот і наближається до амінокислотного складу м'яса; грибний білок містить незначні кількості (1-4 %) нуклеїнових кислот; клітинна стінка грибів тонка. Грибні препарати використовуються для підвищення перетравності грубих кормів і збагачення їх різними біологічно активними речовинами.

До недоліків грибів належить порівняно низький рівень протеїну (20-60% від сухої речовини) і відносно повільний ріст – швидкість подвоєння біомаси грибів складає 4-16 год, дріжджів – 2-3 год.

Мікрроводорості. Одноклітинні водорості є фототрофними мікроорганізмами й потребують особливих умов. Для їх росту необхідно: світловий режим, достатня кількість вуглекислого газу, мінеральних речовин і певний температурний режим, до того ж процес потребує значних об'ємів води.

Найбільш прийнятними продуцентами є зелені протококові водорості роду *Chlorella* і *Scenedesmus*, а також синьоозелена спіралеподібна водорість *Spirulina*. Розмір спіруліни приблизно в 100 разів більший, ніж хлорели і сценедесмуса – 500 мкм. Вона добре росте в лужному середовищі з рН 9-11, а хлорела і сценедесмус – у середовищі, близькому до нейтрального. Протококові водорості мають міцну целюлозну оболонку, а у спіруліни її немає.

Мікрроводорості у штучних умовах культивують в основному на мінеральних середовищах, але вони добре ростуть і на стічних водах, гнойовій біомасі, у солоних, прісних і лужних водоймищах (спіруліна).

Мікрводорості належать до організмів з активним біосинтезом білків, вітамінів, жироподібних та інших біологічно активних речовин. Вміст білка у зелених водоростей складає 45-55 %, а у спіруліни – 60 %. Білок мікрводоростей має у своєму складі усі незамінні амінокислоти, що можна порівняти з білком кормових дріжджів і сої. Натомість білок водоростей має низький вміст сірковмісних амінокислот, а білок спіруліни ще й низький вміст лізину і досить високий вміст нуклеїнових кислот. Перетравність протеїну протококових водоростей складає 45-46 % через міцну їх оболонку, а спіруліни – 70 %.

Біомаса мікрводоростей багата каротином (1500 мг/кг сухої біомаси, що у 7-9 разів більше, ніж у трав'яному борошні вищої якості з люцерни), містить багато вітамінів, макро- і мікроелементів.

Хімічний склад мікрводоростей лабільний і визначається значною мірою умовами їх культивування. Змінюючи склад поживного середовища й інші умови (температуру, освітлення) можна підвищувати в мікрводоростях вміст білка з 8 до 60 %, вуглеводів – з 6 до 37 %, ліпідів – з 5 до 85 %.

Серед мікрводоростей більш перспективною для одержання білка є спіруліна, біомаса якої містить в середньому 65 % білка, однак у білку міститься мало лізину.

③ Незалежно від виду сировини, яка використовується, технологія одержання білка шляхом накопичення біомаси мікроорганізмів має загальну технологічну схему. Основною серед етапів технології є стадія ферментації, а головним апаратом є ферментер, у якому відбувається ріст і розвиток мікроорганізмів-продуцентів. Під *ферментацією* мають на увазі всю сукупність послідовних операцій від внесення у заздалегідь підготовлене живильне середовище продуцента і до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації внаслідок вичерпування поживних елементів середовища, припинення біосинтезу, втрати активності культурою або з інших причин.



У ферментер з культурою мікроорганізмів постійно подається органічна сировина (джерело вуглецю), розчини мінеральних солей, аміак і повітря, а з ферментера відбирається суспензія клітин у водному середовищі.

Мікроорганізми як продуценти білка мають перевагу і в тому, що можуть використовувати як субстрат різноманітні речовини, які в основному є відходами інших виробництв. Джерелом сировини для них є рідкі парафіни нафти, метан природного газу і біогазу, метиловий і етиловий спирти, рослинна сировина, відходи і побічні продукти сільського господарства і промисловості (солома, корзинки соняшника після видалення насіння, костриця льону, коноплі, гичка, дерев'яна тирса, стружка, целюлоза, м'яса, молочна сироватка, гнойова біомаса тощо).

Після ферментації клітини відділяють від водного розчину сепарацією, обробляють теплом і висушують. Продукт може бути випущений у пилоподібній або гранульованій формах. Повноцінність виробленого мікробного білка визначається за вмістом лізину (незамінної амінокислоти). У дріжджах його міститься з розрахунку на білок близько 10 % (для порівняння – в сої вміст становить трохи більше 6 %).

Обов'язковою стадією технологічної схеми одержання білкових речовин є процес очищення газоповітряних викидів (ГПВ), в яких містяться живі клітини мікроорганізмів, білковий пил та інші продукти білкового синтезу.

### ***Питання для контролю:***

1. У чому суть проблеми нестачі кормового білку та які шляхи її вирішення?
2. Дріжджі – як продуценти кормового білку.
3. Недоліки та переваги використання бактерій-продуцентів білка.
4. Особливості одержання кормового білка від пліснявих грибів.
5. Використання мікроводоростей для отримання кормового білку.
6. Опишіть технологію одержання мікробного білка.

## Лекція № 9. Виробництво незамінних амінокислот

1. *Загальна характеристика амінокислот.*
2. *Методи одержання амінокислот.*
3. *Біотехнологія виробництва L-триптофану.*
4. *Біотехнологія одержання L-лізину.*
5. *Біотехнологія виробництва L-треоніну.*

① *Амінокислоти* – це азотомісткі сполуки, молекули яких містять карбоксильну (-COOH) і амінну (-NH<sub>2</sub>) групи, що мають здатність реагувати між собою з утворенням ковалентного пептидного зв'язку. Вони є головним будівельним матеріалом організму, з якого формуються пептиди і білки. Порядок включення амінокислот у поліпептидний ланцюг визначається генетичним кодом (через іРНК).

Більшість мікроорганізмів і рослин можуть синтезувати усі 20 амінокислот. Люди і тварини можуть синтезувати лише 10 амінокислот. Це замінні амінокислоти. Інші 10 амінокислот, що одержали назву незамінних мають надходити ззовні – з їжею або кормом. Серед них такі амінокислоти, як лізин, метіонін, триптофан, гістидин, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, треонін, валін, аргінін. Перші три ще називаються критичними завдяки своїй біологічній дії. Дефіцит в раціоні хоча б однієї із цих амінокислот викликає сповільнення росту дітей і тварин та сприяє виникненню різних патологій. Крім цього, амінокислоти (як замінні, так і незамінні) є важливою сировиною для забезпечення багатьох біотехнологічних процесів, а також використовуються в медицині і харчовій промисловості.

② Промислове виробництво амінокислот базується в основному на трьох процесах: гідроліз природної білоквмісної сировини (рослинного і тваринного

походження), хімічний та мікробіологічний синтез. Одержання амінокислот гідролізом білкових речовин – найдавніший і найменш ефективний метод. Основними його недоліками є: висока вартість одержаних амінокислот, обмеженість сировинних ресурсів тощо.

Хімічний синтез амінокислот досить ефективний. Він дає можливість одержувати сполуки будь-якої структури й організувати виробництво з високим рівнем автоматизації. Однак цей метод має низку суттєвих недоліків.

Так, сучасними методами органічного синтезу можна одержати D- і L-форми амінокислот у будь-яких кількостях, однак вони знаходяться у вигляді *рацематів*, тобто рівних за масою сумішей L- і D-амінокислот. У хімічних реакціях ці ізомери не відрізняються один від одного. Але, як відомо, в організмі тварин (людей) використовується тільки L-амінокислота.

Крім цього, виробництво амінокислот хімічним методом передбачає здійснення великої кількості технологічних операцій. Реалізація практично кожної з них вимагає певного обладнання. Технологія такого виробництва у більшості випадків використовує достатньо токсичні речовини, високоочищені реагенти і передбачає здійснення стадії розділення рацематів, що утворюються. Методи ж розділення рацемічної суміші, у свою чергу, досить складні і потребують значних витрат, а для деяких амінокислот їх взагалі не розроблено.

Мікробний синтез – найбільш перспективний і економічно вигідний спосіб виробництва амінокислот. У сучасній світовій практиці за допомогою цього способу одержують близько 60% усього об'єму вироблених амінокислот. Принцип мікробного методу полягає в аеробному вирощуванні мікроорганізмів у поживних розчинах. Мікробний метод має низку переваг перед хімічним. Перш за все, ферментна система мікробної клітини утворює тільки біологічно активний L-ізомер, що забезпечує його виділення, очищення та випуск технічних препаратів з низькою вартістю і в достатній кількості.

Спеціально підібрані, відселекціоновані, а інколи і сконструйовані методами генетичної інженерії штами-продуценти в процесі життєдіяльності здійснюють так званий *надсинтез L-амінокислот*, тобто виробляють їх у кількостях, які набагато перевищують потребу самих клітин. Надлишок L-амінокислот екскретується в культуральну рідину, звідки їх і добувають.

При виробництві амінокислот у вигляді високоочищених кристалічних препаратів після завершення ферментації проводять виділення клітин продуцента з культуральної рідини. Цільову амінокислоту виділяють із культуральної рідини за допомогою іонного обміну або методом осадження. Елюати або маточні розчини концентрують вакуум-випаровуванням, а технічні кристали, які утворились, очищають шляхом перекристалізації із насиченого розчину. Завершується процес одержання кристалічного препарату, як правило, вакуум-сушкою очищених кристалів і їх упаковкою.

③ Мікробний синтез L-триптофану у промислових обсягах здійснюється як за допомогою спороносних штамів-мутантів бактерій *B. subtilis*, обмежених за тирозином і фенілаланіном (одноетапний спосіб), так і шляхом трансформації різних попередників L-триптофан під дією ферментних систем деяких дріжджів (двоетапний спосіб).

Одноетапний спосіб включає наступні стадії: культивування вихідного штаму-продуцента, виділення і очищення одержаного триптофану та виробництво на його основі кормових і високоочищених препаратів.

Продуктивність мутанта-продуцента складає до 10 г триптофану в 1 л культуральної рідини. Кормовий концентрат триптофану (ККТ) одержують без відокремлення біомаси продуцента шляхом вакуум-випаровування культуральної рідини до 30-40% вмісту сухих речовин з подальшим висушуванням.

Висококонцентровані препарати триптофану одержують з фільтрату культуральної рідини після відділення клітин продуцента. Таким чином одержують технічний препарат триптофану з його вмістом до 45 % від вмісту в культуральній рідині. Одержують також високоочищені препарати триптофану з вмістом до 99%.

Двоетапний шлях мікробного синтезу L-триптофану ґрунтується на проведенні трансформації антранілової кислоти (попередника) під дією ферментних систем *Candidia utilis* в L-триптофан і одержанні культуральної рідини з вмістом його до 6 г/л.

Крім цього, розроблена технологія виробництва культурального триптофану за допомогою технологій рекомбінантних ДНК. Суть методу полягає в тому, що при конструюванні рекомбінантної (гібридної) ДНК на базі плазмиди *E.coli*, до складу останньої вводиться не один ген, а триптофановий оперон. Останній містить п'ять генів, кодує п'ять ферментів, які беруть участь в утворенні L-триптофану з його попередника хоризмату.

④ За вмістом лізину визначається біологічна цінність білка. Він сприяє секреції харчотравних ферментів і транспорту кальцію у клітини, а також покращує загальний азотний баланс в організмі. L-лізин синтезується мікроорганізмами двома принципово різними шляхами.

Мікрободорості, гриби, дріжджі синтез лізину здійснюють із  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти через  $\alpha$ -аміноадіпінову кислоту – аміноадіпінатний (АА) шлях. Регуляція активності ферментів цього шляху досліджена недостатньо, тому мутантів, здатних до надсинтезу лізину, серед цих мікроорганізмів не одержано.

У бактеріальних культур, вищих рослин, деяких водоростей біосинтез лізину відбувається через  $\alpha$ -діамінопімелінову кислоту – діамінопімеліновий (ДАП) шлях, який починається з аспарагінової кислоти. Продуценти лізину –

глутаматпродукуючі коринібактерії (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*), мають мутантні форми, які здійснюють надсинтез L-лізину.

Виробництво лізину включає чотири головних етапи: підготовка поживних субстратів і їх стерилізація; вирощування посівного матеріалу; головна ферментація; зневоднення продуктів ферментації шляхом вакуумного випаровування з подальшим висушуванням розчину у розпорошувальній сушарці або видалення кристалічного лізину.

Основною сировиною для виробництва кормового лізину є патока і кукурудзяний екстракт. Культивування продуцентів і біосинтез лізину проводиться у промислових біореакторах (ферментерах) об'ємом 50-100 м<sup>3</sup>.

Залежно від конкретної мети виробництва на основі культуральної рідини можна одержати такі препаративні форми лізину:

- 1) Рідкий концентрат лізину (РКЛ) отримують шляхом стабілізації культуральної рідини без відокремлення біомаси продуцента з подальшим вакуум-випаровуванням до 35-40 % сухих речовин. Вміст лізину в ньому складає 7-12 %.
- 2) Сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ) одержують шляхом зневоднення рідкого концентрату. Він містить лізину від 10 до 20 %, залежно від використання наповнювачів.
- 3) Кристалічні препарати лізину одержують з культуральної рідини після відокремлення бактеріальної біомаси з вмістом 97-98 % L-лізину.

Такі товарні форми, як РКЛ і ККЛ містять, окрім лізину, і інші біологічно активні речовини – вітаміни В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>4</sub>, РР тощо, які підвищують цінність кормових добавок.

⑤ Треонін синтезується у клітинах мікроорганізмів і рослин. При дефіциті амінокислоти у тварин спостерігається ожиріння печінки, зниження приростів живої маси і погіршується засвоєння інших амінокислот.

Треонін широко використовується також у багатьох біотехнологічних процесах. У медичній промисловості ця амінокислота необхідна для одержання деяких напівсинтетичних антибіотиків. Треонін додається у поживні середовища, призначені для культивування клітин.

Для мікробіологічного виробництва треоніну як продуценти використовують корінебактерії і ентеробактерії. Однак корінебактерії, які інтенсивно продукують глютамінову кислоту і лізин, синтезують треонін з невисокою швидкістю, що робило його промислове виробництво нерентабельним.

Кишкова паличка здійснює біосинтез треоніну із аспарагінової кислоти через низку перетворень. Крім треоніну, з аспарагінової кислоти утворюються лізин, метіонін та ізолейцин, які за нормальних умов витрачаються на синтез білків і їх концентрація в клітині незначна.

Промисловий надпродуцент треоніну одержаний на основі мутантів, виділених з вихідної культури *E. coli* K-12, шляхом використання методів генетичної інженерії, зокрема явища ампліфікації генів. Отриманий штам кишкової палички синтезував треонін на порядок інтенсивніше порівняно з корінебактеріями – основними продуцентами амінокислот. Випробування одержаного треоніну в тваринництві підтвердили його високу якість.

#### **Питання для контролю:**

1. Надайте характеристику стандартним амінокислотам.
2. Охарактеризуйте методи одержання амінокислот.
3. Як відбувається одно- та двоетапне виробництво L-триптофану?
4. Які існують біотехнології одержання L-лізину?
5. Суть мікробіологічного виробництва L-треоніну.

## Лекція № 10. Виробництво вітамінних препаратів

1. *Поняття, класифікація, напрями одержання вітамінів.*
2. *Отримання препаратів жиророзчинних вітамінів.*
3. *Виробництво водорозчинних вітамінів.*

① Забезпечення потреб людини і сільськогосподарських тварин достатньою кількістю вітамінів є важливою проблемою, яку в сучасних умовах неможливо вирішити лише за рахунок використання традиційних природних вітамінних ресурсів. Крім того, вітаміни, їх коферментні форми і похідні дедалі ширше застосовуються як препарати для лікування різних форм гіповітамінозів і авітамінозів, а також інших захворювань.

Вітаміни – низькомолекулярні органічні сполуки різної хімічної природи, що необхідні для життєдіяльності живого організму в малих дозах, і не утворюються в ньому в достатній кількості, через що повинні надходити із їжею. Традиційно за фізико-хімічними властивостями вітаміни поділяють на дві групи: водорозчинні і жиророзчинні. До водорозчинних належать: В<sub>1</sub> (тіамін), В<sub>2</sub> (рибофлавін), В<sub>3</sub> (РР) (нікотинамід, нікотинова кислота), В<sub>5</sub> (пантотенова кислота), В<sub>6</sub> (піридоксин), Н (В<sub>7</sub>) (біотин), В<sub>9</sub> (В<sub>с</sub>) (фолієва кислота), В<sub>12</sub> (кобаламін), С (аскорбінова кислота); до жиророзчинних: А (ретинол) і провітамін А – β-каротин, D (кальциферол, холекальциферол) і провітаміни – ергостерин, холестерин, Е (токоферол), К (філохінон); їх коферментні форми та різні похідні.

Вітаміни групи В ще називають кофакторними вітамінами, тому що вони входять у структуру коферментів. Ці вітаміни беруть участь у метаболізмі як вищих організмів, так і мікробних клітин. Механізм дії інших вітамінів вивчений недостатньо. Деякі з них, наприклад С, А, D, не функціонують в мікробних клітинах, хоча провітаміни останніх двох – β-каротин і ергостерин – беруть участь у життєдіяльності певних типів мікроорганізмів і ними синтезуються.



На сьогодні існують такі напрями вирішення проблеми одержання вітамінів і коферментів мікробіологічним синтезом:

- 1) Використання мікроорганізмів продуцентів, в основному надсинтетиків, і спеціальних режимів їх культивування. До цієї категорії належать уже існуючі біотехнології одержання вітамінів B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, каротиноїдів.
- 2) Використання біомаси мікроорганізмів, яких вирощують у промислових масштабах у якості комплексних вітамінних препаратів.
- 3) Використання мікроорганізмів для здійснення окремих стадій процесу синтезу вітамінів. Для вирощування таких мікроорганізмів можливості використання нових видів нехарчової сировини розширюють межі цього напрямку.

Крім вітамінів, мікробіологічним шляхом одержують інші речовини вітамінної природи. Дедалі ширше їх застосовують у медичній практиці, а мікробіологічний синтез у багатьох випадках єдиний або найбільш прийнятний спосіб їх одержання.

Варто наголосити, що багато вітамінів успішно одержують хімічним синтезом. Однак для деяких вітамінів і багатьох коферментів мікробіологічний спосіб їх одержання поки що залишається єдиним або найбільш ефективним.

② Каротиноїди локалізуються у вигляді складних ефірів і глікозидів у клітинній мембрані мікроорганізмів або у вільному стані – в ліпідних гранулах у цитоплазмі. З однієї молекули β-каротину при гідролізі утворюються дві молекули вітаміну A<sub>1</sub>. Це відбувається, наприклад, у кишечнику людини.

Як продуценти каротиноїдів можна використовувати бактерії, дріжджі, міцеліальні гриби. Найчастіше використовують зигоміцети *Blakeslea trispora* і *Choanephora conjuncta*. При спільному культивуванні вони можуть утворювати 3-4 г каротину на 1 л середовища. Поживні середовища для них досить складні.

Спочатку штами вирощують порізно, а потім – спільно при температурі 26°C і посиленій аерації з подальшим перенесенням в основний біореактор. Умови культивування зберігаються. Тривалість ферментації – 6-7 діб. Каротиноїди вилучають ацетоном (або іншим полярним розчинником) і переводять у неполярний розчинник. У випадках вилучення білково-каротиноїдних комплексів використовують поверхнево-активні речовини в концентрації 1-2 %. З метою очищення і більш тонкого розділення гомологів використовуються методи хроматографії або зміни розчинників. Вітамін А<sub>1</sub> порівняно легко можна одержати з β-каротину при гідролізі.

У разі виготовлення каротиновмісної біомаси для згодовування тваринам і птахам можливе поєднання використання її з вітаміном А чи без нього. Для застосування вітаміну А з лікувальною метою його виготовляють в капсулах для перорального вживання.

Вітамін D – це група споріднених сполук, основою яких є ергостерин, що виявлений в клітинних мембранах еукаріот. Тому, наприклад, пекарські чи пивні дріжджі використовують для одержання ергостерину як провітаміну з антирахітичною дією. Вміст ергостерину в дріжджових клітинах коливається у межах 0,2-11 %. Трансформація ергостерину у вітамін D<sub>2</sub> (кальциферол) відбувається під впливом ультрафіолетового опромінення.

Крім дріжджів продуцентами ергостерину можуть бути міцеліальні гриби – аспергіли і пеніцили, в яких міститься 1,2-2,2% ергостерину. Виявлено, що полієнові антибіотики, які діють на клітинну мембрану дріжджів, помітно стимулюють збільшення вмісту ергостерину в біомасі.

При одержанні ергостерину у виробничих умовах можна виділити такі етапи: розмноження вихідної культури і накопичення інокуляту; ферментація; сепарування клітин; опромінення клітин ультрафіолетовими променями; висушування і пакування цільового продукту.

Опромінені сухі дріжджі використовують у тваринництві. У промисловості їх випускають під назвою «кормові гідролізні дріжджі, збагачені вітаміном D<sub>2</sub>». У такому препараті міститься не менше 46 % сирого протеїну, незамінні амінокислоти (лізин, метіонін, триптофан) і 5000 МО вітаміну D<sub>2</sub>/г.

Окрім того, промислові препарати вітаміну D<sub>2</sub> випускають у формі кислотного фільтрату, масляного концентрату та у кристалічній формі.

③ Рибофлавін міститься в клітинах різних мікроорганізмів, будучи коферментом у складі флавопротеїнів (перш за все відповідних ферментів класу оксидоредуктаз – ФМН, ФАД). Продуцентами рибофлавіну (флавопротеїнів) можуть бути бактерії, дріжджі і нитчасті гриби. Однак найбільш перспективними є штами, які утворюють на рідких середовищах 0,5 г і більше рибофлавіну в 1 л середовища. До таких організмів належать *Ashbyii gossypii*, *Eremothecium ashbyii* і *Candida guilliermondii*.

Методами генетичної інженерії вдалось одержати штам сінної палички, яка утворює приблизно 6 г рибофлавіну в 1 л культурального середовища, що містить патоку, білково-вітамінний концентрат і його гідролізат.

Високий вихід рибофлавіну у *E. ashbyii* корелює з азотом пуринів та іншими азотистими джерелами, вміст яких у середовищі має бути достатнім. Як джерело вуглецю використовують глюкозу або цукрозу, дріжджовий або кукурудзяний екстракт, соєве борошно, масла (жири).

Зазвичай тривалість ферментації становить 5 діб при рН 5,5-7,7. Після використання цукрози (приблизно через 30 годин) починає помітно накопичуватися вітамін B<sub>2</sub>, спочатку – в міцелії, а потім – у культуральній рідині.

Для використання в годівлі тварин всю біомасу висушують і в одержаному сухому продукті вологістю 8% міститься 1,5-2,5% рибофлавіну, 20% білка, тіамін, нікотинова кислота, піридоксин, цианкобаламін, мікроелементи та інші речовини.

Цианкобаламін одержують тільки мікробіологічним синтезом. Його продуцентами є прокаріоти і перш за все пропіоновокислі бактерії. Мутанти-надсинтетики *Propionibacterium shermanii* M-82 і *Pseudomonas denitrificans* M-2436 продукують на рідкому середовищі до 58-59 мг/л цианкобаламіну.

Враховуючи важливу функцію вітаміну в організмі людини (він є протианемічним фактором), його світове виробництво досягло 10 т на рік, з яких 6,5 т витрачають на медичні потреби, а 3,5 т – у тваринництві.

Вітчизняне виробництво цианкобаламіну базується на використанні *P. freudenreichii* Var. *shermanii*, яка культивується у періодичному режимі без доступу кисню. Середовище зазвичай містить глюкозу, кукурудзяний екстракт, солі амонію і кобальту. рН близько 7,0 підтримують додаванням  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Тривалість ферментації 6 діб. Через 3 доби у середовище додають 5,6-диметилбензимидазол – попередник вітаміну  $\text{B}_{12}$  і продовжують ферментацію ще 3 доби.

Цианкобаламін накопичується в клітинах бактерій, тому операції з виділення вітаміну полягають у наступному: сепарування клітин, екстрагування водою при рН 4,5-5,0 і температурі 85-90°C за присутності стабілізатора (0,25%й розчин нітриту натрію). Екстракція відбувається протягом години, після чого водний розчин охолоджують, нейтралізують розчином  $\text{NaOH}$ , додають коагулянти білка (хлорид заліза тривалентного і алюмінію сульфату) з подальшою фільтрацією.

При реалізації даного біотехнологічного процесу потрібно зважати на високу чутливість до світла вітаміну  $\text{B}_{12}$ . Через це усі операції необхідно проводити в умовах затемнення (або при червоному світлі).

Аскорбінова кислота – це протицинговий вітамін, який міститься в усіх вищих рослинах і тваринах. Тільки людина і мікроби не синтезують її, але людям вона вкрай необхідна, а мікроби не потребують цього вітаміну. Однак певні види оцтовокислих бактерій синтезують напівпродукт аскорбінової кислоти – L-

сорбозу. Таким чином, весь процес одержання аскорбінової кислоти є змішаним, тобто хіміко-ферментативним.

Біологічна стадія процесу каталізується мембранозв'язаною поліолдегідрогеназою, як правило, штамом *Gluconobacter oxydans*. Ферментацію проводять на середовищах, які містять сорбіт (20%), кукурудзяний або дріжджовий екстракт, при інтенсивній аерації (8-10 г O<sub>2</sub>/л/год). Вихід L-сорбози може сягнути 98 % за 1-2 доби. При досягненні культурою *log*-фази можна додатково вводити в середовище сорбіт, доводячи його концентрацію до 25%. Також встановлено, що *G. oxydans* може окислювати і вищі концентрації поліспирту (30-50 %), який утворюється на останніх стадіях процесу. Ферментацію бактерій проводять в періодичному або безперервному режимі. Доведена можливість одержання L-сорбози із сорбіту за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному гелі бактеріальних клітин.

Аскорбінову кислоту використовують як антиоксидант у медицині, а також у харчовій промисловості.

#### **Питання для контролю:**

1. Що таке вітаміни і які вони бувають?
2. Які Вам відомі напрями одержання вітамінів?
3. Біотехнології отримання каротиноїдів
4. Які існують варіанти отримання вітамінів групи D?
5. Біотехнології виробництва рибофлавіну.
6. Опишіть принципи отримання мікробіологічного цианкобаламіну.
7. Яка технологія отримання аскорбінової кислоти?

## Лекція № 11. Виробництво ферментних препаратів, антибіотиків та пробіотиків

1. Застосування ферментних препаратів у сільському господарстві.
2. Використання антибіотиків у тваринництві.
3. Пробиотики для сільськогосподарських тварин.

① Одним з важливих напрямів сучасній біотехнології є отримання на основі культивування мікроорганізмів і використання в сільському господарстві різних ферментних препаратів, які можуть застосовуватися в процесі приготування кормів для сільськогосподарських тварин як добавки в цілях покращання їх засвоюваності, а також у ветеринарії для профілактики і лікування шлункових і паразитарних захворювань.

Основний компонент кормів сільськогосподарських тварин – рослинна продукція (зерно, силос, грубі корми і ін.), що містить досить багато важкоперетравних речовин – клітковина, лігнін, геміцелюлоза. Навіть у жуйних тварин, що містять в передшлунку (рубці) активні штами целюлозоруйнуючих мікроорганізмів, клітковина перетравлюється на 40-65%. Не повністю перетравлюються також рослинні білки (60-80%), ліпіди (60-70%), крохмаль і поліфруктозиди (70-85%), пектинові речовини.

З метою покращання перетравності і підвищення ефективності використання рослинних кормів у раціони сільськогосподарських тварин вводять ферментні препарати (0,1-1,5% від сухої маси корму), отримані з мікроорганізмів, що містять активні комплекси гідролітичних ферментів. Препарати мікробних ферментів зазвичай отримують з культур бактерій або мікроскопічних грибів. Деякі види бактерій (наприклад, *B.subtilis*) виділяють гідролітичні ферменти в культуральне середовище, тому їх ферментні препарати зазвичай виробляють шляхом концентрування і висушування за певних умов

культуральної рідини. Якщо джерелом ферментів є мікроскопічні гриби (*Aspergillus, Trichoderma, Fusarium*), то ферментний препарат готують шляхом висушування поверхневої культури цих мікроорганізмів. Очищені ферментні препарати отримують екстракцією ферментів з клітин мікроорганізмів відповідним розчинником і осадженням етанолом.

Ферменти, які використовують при годівлі тварин покращують засвоєння кормів, полегшують травлення корму, допомагають знизити кількість незасвоєння кормів. Ферменти незамінні при відгодівлі тварин, бо саме вони допомагають покращити ріст тварин, збільшити масу їхнього тіла, покращують вихід м'яса та яєць, знижують смертність тварин та птиці, підвищують однорідність поголів'я.

Кормові ферменти не діють безпосередньо на мікрофлору кишечника, але впливають на їх харчову базу. Ксиланази та целюлази, які входять до складу ензимних комплексів, руйнують некрохмальні поліцукри клітинних оболонок, роблять крохмаль і білок зернових кормів більш доступним для травної системи тварини. Завдяки дії ферментів знижується в'язкість хімусу, прискорюється його проходження у кишечнику. В сукупності ці фактори дозволяють контролювати кишкову мікрофлору на бажаному рівні. Таким чином, знижується конкуренція з боку мікроорганізмів за харчові ресурси, та – хоча і не так, як при використанні антибіотиків – зменшується ризик розвитку патогенної мікрофлори.

② *Антибіотики* – це специфічні продукти життєдіяльності або їхні модифікації, що характеризуються високою фізіологічною активністю щодо певних груп мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей тощо) або злорякісних пухлин, вибірково затримуючи їхній ріст або повністю пригнічуючи розвиток.

Антибіотики надзвичайно різноманітна та багаточисельна група сполук, яка знайшла своє застосування в багатьох галузях. Основними галузями застосування антибіотиків є:

- 1) медицина – лікування інфекційних хвороб, які були невиліковними (туберкульоз, чума, бруцельоз, пневмонії, септичні процеси), лікування певних форм злоякісних пухлин;
- 2) сільське господарство – як лікувальні препарати у тваринництві і рослинництві, деякі антибіотики є стимуляторами росту тварин.
- 3) в консервній промисловості – для знищення клостридіальних та термофільних бактерій, стійких до стерилізації. В харчовій промисловості використовують нізин, який знищує термофільні бактерії, що дає змогу уникнути термообробки при консервуванні.
- 4) діагностичні цілі – оскільки деякі з антибіотиків характеризуються виключною специфічністю, їх можна використати для ідентифікації мікроорганізмів.

Механізми пошкоджуючої дії антибіотиків на клітини різні. Окремі антибіотики (пеніциліни, новобіоцин, цефалоспорини) пригнічують процеси утворення клітинних стінок; інші (стрептоміцин, поліміксини) змінюють проникність мембран; треті (граміцидини) пригнічують окислювальне фосфорилування; хлорамфенікол пригнічує окремі етапи синтезу білка на рибосомах; азасерин і сарколізин – викликають порушення в процесах синтезу нуклеїнових кислот тощо.

Продуцентами антибіотиків є бактерії, актиноміцети, міцеліальні гриби.

Описано близько 600 антибіотиків, які синтезуються бактеріями. Ці антибіотики за хімічною будовою належать до поліпептидів і низькомолекулярних білків. Проте в промислових масштабах випускається незначна кількість антибіотиків бактеріального походження. Найважливішими їх них є: граміцидин (*Bacillus brevis*), поліміксини (*Bac. polymyxa*, *Bac. circulans*), бацитрацини (*Bac. licheniformis*), нізини (*Streptococcus lactis*).

Міцеліальні гриби також синтезують чималу кількість антибіотиків (близько 1200). Найбільш відомі серед них наступні: пеніциліни (*Penicillium chrysogenum*,



*P. brevicompactum*, *Aspergillus flavus*, *Asp. nidulans*), цефалоспорини (*Cephalosporium acremonium*), фумалгін (*Aspergillus fumigatus*), гризеофульвін (*Penicillium nigricans*, *P. griseofulvum*), трихоцетин (*Trichthecium roseum*).

Антибіотики для кормових цілей використовуються у рецептурі преміксів у вигляді неочищених препаратів – це суха біомаса продуцента, яка містить різні амінокислоти, ферменти, вітаміни. До сільськогосподарських антибіотиків належить, наприклад, хлортетрациклін (біоліт, біоміцин) бацитрацин, гігроміцин, гризин тощо. Пригнічуючи розвиток хвороботворних мікроорганізмів, тим самим знижуючи захворюваність і смертність, антибіотики прискорюють ріст і розвиток тварин. Так, застосування антибіотиків у свинарстві забезпечує додатковий приріст від кожної тисячі тварин до 120 ц при скороченні витрати кормів на 5-10%. При додаванні антибіотиків у корм курей-несучок можна додатково отримати до 15 тис. яєць за рік від 1000 курей.

Боротьба з фітопатогенними мікроорганізмами полягає у використанні таких антибіотиків як тетрациклін, гризеофульвін. Основна вимога до цих препаратів: вони не повинні використовуватись у медичних цілях.

Пошук продуцентів нових антибіотиків безперервно продовжується. Величезні перспективи для отримання високопродуктивних штамів відкриваються у зв'язку з розвитком новітніх методів клітинної і генетичної інженерії. Окрім удосконалення природи мікроорганізмів-продуцентів антибіотичних речовин, оптимізації апаратури і технологій, велике значення для отримання нового спектру препаратів, що володіють цінними властивостями в порівнянні з початковими, має так звана модифікація антибіотиків і отримання напівсинтетичних препаратів. Мікробіологічні антибіотики піддають хімічній модифікації, в результаті чого можливе отримання препаратів з більш вираженою фізіологічною дією.

③ Сьогодні виробники преміксів та білково-мінерально-вітамінних добавок до складу своєї продукції вводять натуральні кормові препарати різної природи та різноманітної дії, які, хоча й збільшують вартість кормових добавок, але значно впливають на обмін речовин в організмі та сприяють підвищенню продуктивності тварин і птиці.

*Пробіотики (еубіотики)* – корисні мікроорганізми, які у нормі входять до складу кишкового біоценозу, але в недостатній кількості. Потрапляючи у кишково-шлунковий тракт, пробіотичний мікроорганізм заселяє кишечник, тим самим витісняє патогенні організми з кишкового епітелію та створює антимікробні умови. Однак треба враховувати, що при надмірному надходженні пробіотик сам починає конкурувати з організмом-господарем за кормове середовище, наприклад, за вітаміни. І тому їх необхідно використовувати тільки у збалансованих раціонах.

Пребіотики – це відносно нова група кормових добавок, ще остаточно не сформована і не визначена. До них відносять деякі органічні сполуки невеликої молекулярної маси, такі як олігоцукриди та органічні кислоти, які сприяють розвитку корисних мікроорганізмів та обмежують життєдіяльність патогенної мікрофлори. Інакше кажучи, *пребіотики* – це субстрат та стимулюючі речовини для пробіотиків. Крім того, до цієї групи можна віднести інгібітори грибів та мікотоксинів.

У сучасному трактуванні пробіотики являють собою біопрепарати, що представлені стабілізованими культурами симбіотичних мікроорганізмів і продуктів їхньої життєдіяльності, які мають сприятливий вплив на здоров'я людини або тварин.

До мікроорганізмів, які використовуються як основа для виробництва пробіотиків, висувають ряд вимог:

- ізольованість із організму тих видів тварин і людини, для яких вони будуть призначені;

- позитивний вплив на організм господаря, підтверджений лабораторними дослідженнями і клінічними спостереженнями;
- за тривалого використання не повинні викликати побічних ефектів;
- високий колонізаційний потенціал, тобто мають зберігатись у травному тракті до досягнення максимальної позитивної дії;
- стабільні характеристики як у клінічному, так і в технологічному плані;
- висока швидкість росту і розмноження в умовах, найближчих до таких у кишкового тракті, за їхнього культивування *in vitro*.

Найбільш перспективними препаратами пробіотиків, що використовують у сільському господарстві (ветеринарії), є препарати на основі *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, серед них ті види, що є складовою частиною мікробіоценозів рубця жуйних тварин, зобу птиці, шлунково-кишкового тракту поросят. Більшість пробіотиків для сільського господарства базуються на монокультурах. Серед найбільш відомих – Біовіт, Лактосан, Лактовіт. В Україні розроблено препарат Бактерін SL на основі *B. subtilis* та *B. licheniformis*, які використовують для лікування діареї у телят.

#### **Питання для контролю:**

1. Для чого застосовують ферментні препарати у тваринництві?
2. Що таке антибіотики та у яких галузях вони застосовуються?
3. Які Ви знаєте продуценти і механізм дії антибіотиків?
4. Застосовують антибіотиків у тваринництві.
5. Охарактеризуйте про- і пребіотичні препарати.
6. Які висувають вимоги до мікроорганізмів для виробництва пробіотичних препаратів?

## Лекція № 12. Біотехнологія утилізації відходів тваринництва

1. *Негативний вплив відходів тваринництва на навколишнє середовище.*
2. *Використання гною як органічного добрива.*
3. *Мінералізація органічних речовин у ґрунті та водоймищах.*
4. *Використання гною в раціонах тварин.*
5. *Основи вермікультування.*

① *Утилізація* (від лат. *utilis* – корисний) – застосування з користю, наприклад відходів.

Експлуатація тваринницьких ферм і комплексів супроводжується значною концентрацією тварин в обмеженому просторі та порушенням рівноваги між поголів'ям і площею земельних угідь, що супроводжується накопиченням великої кількості гною, стічних вод та інших органомістких відходів у розрахунку на одиницю земельної площі. Гній містить значну кількість патогенних мікроорганізмів, яєць і личинок гельмінтів, насіння бур'янів, солей важких металів та різних ксенобіотиків. Потрапляючи у ґрунт і водоймища, гнойова рідина спричиняє забруднення ґрунтових вод, біологічне зараження ґрунту патогенними мікроорганізмами та викликає масові отруєння водних організмів. У воді різко збільшується вміст аміаку і зменшується кількість кисню.

Такі компоненти відходів, як метан, діоксид вуглецю, аміак і сірководень, забруднюють повітря. Метан, потрапляючи в атмосферу, зумовлює парниковий ефект, який у 22-30 разів перевершує вплив діоксиду вуглецю і призводить до глобальних змін клімату.

Проблеми поглиблюються тим, що сільськогосподарські угіддя, як біологічні системи утилізації, здатні сприймати органічні добрива у вигляді гною в

обмеженій кількості. Критерієм є вміст азоту, максимально допустима концентрація якого складає 250-300 кг/га.

Таким чином, гнойова біомаса є забруднювачем навколишнього середовища як органічними, так і біогенними елементами. На її частку припадає 43-66% загального біологічного навантаження на природні системи. Для усунення цих негативних явищ необхідна спеціальна технологічна обробка гною, що дало б можливість підвищити концентрацію поживних речовин в одиниці об'єму гною і одночасно усунути запахи, загальмувати або знищити патогенні мікроорганізми, знизити вміст токсичних речовин та викиди шкідливих газів у атмосферу.

Усі існуючі методи утилізації відходів тваринництва умовно можна поділити на дві групи: традиційні і нетрадиційні. При традиційних методах для утилізації використовують такі природні біологічні системи, як ґрунт і водоймища. Утилізація здійснюється біологічними агентами (об'єктами) – мікроорганізмами, дощовими хробаками, членистоногими тощо. Вибір біологічної системи суттєво залежить від консистенції гнойової біомаси, яка, залежно від технології утримання і гноєвидалення, може бути: твердою (вологість до 80 %), напіврідкою (вологість 81–90 %) і рідкою (вологість більше 91 %). До нетрадиційних методів належить утилізація гною шляхом метанового зброджування та вермікультивування з використанням біологічних агентів – анаеробних метаноутворюючих мікроорганізмів і дощових хробаків.

② Використання гною для покращення родючості ґрунтів зумовлено тим, що в сухій речовині гною міститься значна кількість азоту (1,9-6,5%), калію (1,0-2,9%), фосфору (0,2-2,7%) і органічної речовини (70-85%). За еталон органічного добрива прийнята тонна безпідстилкового гною, після переробки якого (до часу внесення у ґрунт) у ньому міститься 35-40% сухої речовини, 0,05% азоту, 0,25% фосфору і 0,6% калію. Крім цього, гній є джерелом гумусу – основного фактора родючості ґрунтів. У середньому 1 т гною дає 40-50 кг гумусу. Тому гній

позитивно впливає на родючість, фізико-хімічні, агрофізичні та біологічні властивості ґрунту. Як джерело макро- і мікроелементів, вуглекислого газу, гній суттєво поліпшує баланс біогенних елементів у ґрунті. Внесення гною у ґрунт значно підвищує його енергоємність, що є одним із факторів, який сприяє збільшенню виходу наземної біомаси з одиниці земельної площі, а також підвищенню синтетичної активності аутотрофних мікроорганізмів.

Цей метод використовують в основному для утилізації твердої фракції гною (підстилковий гній) вологістю не вище 70 %. Його зберігають на спеціальних майданчиках для накопичення, карантинування і біотермічного знезараження. Біотермічний метод базується на утворенні в знезаражуваній масі високої температури (60°C) і витримуванні протягом одного місяця у теплий період року і двох місяців – у холодний. Якщо вологість гною перевищує 70 %, період витримування треба збільшити до 5–6 місяців. Після цього гній вивозять на поля під заорювання.

У ґрунті органічні речовини гною трансформуються аутотрофними мікроорганізмами й іншими біологічними об'єктами (хробаками, членистоногими). Неорганічні речовини адсорбуються частинками ґрунту або осаджуються, але не руйнуються. Особлива увага приділяється важким металам, тому їх кількість у ґрунті суворо лімітується.

Рідкий гній (безпідстилковий ВРХ і гнойові стоки свинарських комплексів) спочатку розділяють у відстійниках на тверду фракцію і рідку або стічні води. Рідка фракція теж використовується як рідке органічне добриво для поливу сільськогосподарських культур. При зрошуванні стічними водами відбувається їх ґрунтове доочищення, що створює сприятливі умови для охорони навколишнього середовища.

Широке розповсюдження методу гальмується санітарно-гігієнічними та економічними вимогами. Так, патогенні мікроорганізми, які містяться в гнойовій біомасі, здатні тривало зберігатись у зовнішньому середовищі і можуть бути

причиною епідемій та епізоотій. Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя у цьому випадку можна досягти за рахунок знезараження відходів тваринництва термічною стерилізацією, що є енергоємним заходом. Також значні економічні проблеми пов'язані з витратами на видалення, транспортування, зберігання і використання гною в рослинництві.

③ Методом мінералізації органічних речовин утилізують рідку фракцію, тобто стічні води. Всі процеси відбуваються за рахунок життєдіяльності різних груп організмів (бактерій, грибів, водоростей, найпростіших, хробаків і членистоногих), які використовують органічні та неорганічні сполуки стічних вод як поживні речовини і джерело енергії. Аеробні мікроорганізми повітря перетворюють органічні речовини на мінеральні сполуки – аміак, діоксид вуглецю і воду.

Серед відомих методів очищення стічних вод біологічне знезараження залишається найбільш доступним і надійним у санітарному відношенні.

Існують дві великі групи аеробних процесів біологічного очищення стічних вод – екстенсивні та інтенсивні. До екстенсивних належать методи, не пов'язані безпосередньо з керованим культивуванням мікроорганізмів – це поля зрошення, поля фільтрації, біоставки. Мікроорганізми, які знаходяться у верхніх шарах ґрунту полів зрошення і фільтрації або у воді біоставків, утворюють біоценози, за рахунок діяльності яких проходить очищення води.

В основі інтенсивних способів лежить діяльність активного мулу або біологічної плівки, тобто біоценозу, який природно виникає і формується на конкретному виробництві залежно від складу стічних вод і вибраного режиму очищення. Формування біоценозу – процес досить тривалий і проходить постійно під час очищення стічних вод у спеціальних спорудах – аеротенках або біологічних фільтрах.

④ До раціонів сільськогосподарських тварин додається переважно курячий послід. Гній попередньо висушується і обеззаражується, а за наявності підстилки – подрібнюється. Це вимагає певного обладнання і значних витрат енергії.

Крім того, до сьогодні нема одностайної оцінки якості продукції, одержаної на раціонах з добавками гною. Але передбачається, що при тривалому використанні гною як домішки до раціонів тварин у тваринницькій продукції збільшується вміст важких металів, антибіотиків та інших чужорідних речовин (ксенобіотиків).

Цей метод має і соціально-психологічну проблему, яка виникає при використанні продукції, одержаної з добавками гною. Через це метод не має широкого розповсюдження і вимагає більш детального вивчення.

⑤ Ефективним і екологічно безпечним методом утилізації різних відходів (тваринництва, рослинництва, побутових і промислових) є метод вермікультивування, тобто використання дощових хробаків.

Метод вермікультивування дає можливість трансформувати різні відходи, які до цього були основними забруднювачами навколишнього середовища, з одного боку, в повноцінний білок тваринного походження, придатний для використання у годівлі тварин та харчуванні людей (хробачна біомаса), а з іншого боку – у зернисте гумусне добриво (біогумус). На компост за допомогою дощових хробаків переробляють навіть відходи, які важко піддаються утилізації – відходи целюлозо-паперової промисловості.

Промислове вирощування хробаків можна проводити як просто неба, так і в закритих приміщеннях. Усі розрахунки, пов'язані з облаштуванням ділянок для вермікультивування, заселенням та годівлею хробаків, доглядом за ними й іншими операціями, виконуються з розрахунку на стандартну грядку, яка



називається ложе. Ложе – це одиниця виміру, якою користувалися американські дослідники, з ділянкою площею 2 м<sup>2</sup> (2 x 1 м).

Щільність заселення одного ложа може коливатись від 30 до 100 тис. хробаків (дорослих, молодих і коконів з яйцями). На 1 ложе потрібно 10-12 ц органічних відходів на рік. Із них 40 % використовується на задоволення життєвих потреб хробаків, а 60 % виділяється у вигляді копролітів, тобто біогумусу. Одне ложе дає щорічно 4-6 ц біогумусу і близько 30-100 кг біомаси хробака.

Цілорічне вермікультивування з влаштуванням лож на відкритих земельних ділянках можливе тільки в регіонах з м'яким кліматом, тому що взимку активність хробаків значно знижується, а догляд за ними ускладнюється. А в інших регіонах – сезонне – з квітня по жовтень.

Кормом для хробаків є різні органічні відходи з високим вмістом целюлози, які пройшли процес ферментації. Основою раціону для хробаків є гнойова біомаса, до якої додають певну кількість інших органічних відходів.

Для одержання якісного корму для хробаків до вихідного органічного субстрату (відходів) існують вимоги: вологість 70-80 %, рН 6,8-7,2, вміст окислів заліза не більше 10 %, відсутність твердих частин – металевих, дерев'яних, камінців, скла тощо.

Для проведення ферментації органічні відходи буртують на рівному майданчику з допустимим нахилом. Бурти можуть мати різні розміри, що залежить від наявної робочої сили і засобів механізації. Бурти мають бути витягнуті з півночі на південь для кращого прогрівання субстрату.

В умовах доступу води і кисню під впливом мікроорганізмів-аеробів, які є на субстраті (грибів, актиноміцетів, бактерій), органічні відходи розкладаються. В результаті гідролітичного розщеплення високомолекулярних сполук (білків, жирів, вуглеводів) утворюються проміжні й кінцеві низькомолекулярні продукти, які споживаються хробаками.

***Питання для контролю:***

1. Яким чином відходи тваринництва впливають на оточуюче середовище?
2. Позитивні і негативні боки використання гною як органічне добриво.
3. У чому суть мінералізації органічних речовин стічних вод?
4. Яка доцільність використання гною у раціонах тварин?
5. Що таке вермікультивування та які його особливості?

## Лекція № 13. Біотехнологія одержання біогазу

1. *Загальні особливості біометаногенезу.*
2. *Склад біогазових установок.*
3. *Продукти біометаногенезу і їх використання.*
4. *Класифікація біогазових установок за принципом дії.*

① Одним із найбільш перспективних методів утилізації відходів агропромислового комплексу є їх біоконверсія в енергоносії шляхом мікробіологічної ферментації. Метанове анаеробне зброджування є найбільш раціональним шляхом використання енергії відходів. Коефіцієнт трансформації енергії біомаси в енергію метану при цьому досягає 80 %.

Метаногенез відбувається у спеціальних біогазових або біоенергетичних установках (БГУ або БЕУ), у яких за рахунок анаеробної біоконверсії органічних речовин метаноутворюючими мікроорганізмами одержують енергоносії у вигляді біогазу, а також високоякісне знешкоджене органічне добриво і, навіть, кормові добавки.

Крім енергетичної і економічної проблем, біотехнологія анаеробного зброджування дає можливість вирішувати екологічні та санітарно-гігієнічні проблеми. У результаті переробки гною шляхом анаеробного бродіння гине патогенна мікрофлора, яйця і личинки гельмінтів, насіння бур'янів, а також відбувається дезодорація гною.

Процес біометаногенезу відбувається за участю метаноутворюючих мікроорганізмів, яких ідентифіковано від 30 до 50 видів. Це симбіотичне угруповання і завдяки тому, що воно може змінювати свої шляхи ферментації, функціонує як саморегулююча система, яка підтримує оптимальні значення рН, окислювально-відновний потенціал і термодинамічну рівновагу в реакторі.

Формування мікрофлори метантенка відбувається за рахунок мікроорганізмів, які потрапили в нього разом з субстратом (гноювою біомасою, стічними водами тощо). Поряд з облигатними анаеробами в метантенку можуть бути і факультативні анаероби. Загальна кількість бактерій в субстраті коливається від 1 до 15 мг/мл.

*Біометаногенез* – це багатостадійний процес, у ході якого біополімери перетворюються на ацетат, форміат, метанол, метиламін, оксид і діоксид вуглецю, аміак, сірководень і водень. Біометаногенез відбувається у три послідовні етапи: гідроліз, ацидогенез і власне метаногенез, кожен з яких здійснюється певною групою мікроорганізмів.

② *Біогазові установки* – це комплект устаткування, що залежно від техніко-технологічного рівня включає: ємність для збирання і зберігання гною, резервуар для зброджування гною (ферментер, реактор, метантенк, бродильна камера, дайджестер), резервуар для збирання біогазу (газозбірник, газхолдер), нагрівальні та перемішувальні пристрої, системи трубопроводів, pomp і газових компресорів, центрифужових пристроїв, контрольно-вимірювальної апаратури і засобів автоматизації.

*Біогазовий реактор* – це основний елемент БГУ будь-якого технологічного рівня, у якому відбувається метанова ферментація. З резервуару для збирання гною перемішану біомасу подають до камери ферментації, де починається процес виробництва біогазу. *Ферментаційна камера* – це герметичний теплоізований резервуар, оснащений обладнанням для подачі нових порцій сировини, відведення біогазу і шламу та механізмами для підтримки однорідності біомаси в камері (пристосування для перемішування маси та розбивання кірки), а також системами підтримки необхідної температури процесу ферментації.

Ємність резервуарів для біогазу (газхолдерів) залежить від добового виробництва біогазу та його витрат. Проте вона не має бути меншою за максимальне добове виробництво біогазу. Однак витрати на газхолдери складають суттєву частину загальних витрат на БГУ. Тому на практиці не будують надто великих місткостей, а в разі необхідності надлишок виробленого біогазу викидають у повітря.

Бродильна камера має відповідати наступним вимогам: бути абсолютно герметичною, мати досконалу теплоізоляцію і високу корозійну стійкість. Всередині камери повинна підтримуватися постійна температура (залежно від температурного режиму), бо метаноутворюючі мікроорганізми дуже чутливі до різких коливань температури. Тому біомаса, яка надходить в реактор, підігрівається за допомогою спеціальних пристроїв до необхідної температури. Для цього витрачається орієнтовно до 30 % влітку і 60 % взимку енергії виробленого біогазу.

У процесі ферментації біомаса в реакторі має тенденцію до розділення на три фракції. Верхня – кірка утворюється з великих частин, які піднімаються бульбашками утвореного біогазу. Через деякий час вона може стати досить твердою і заважатиме виділенню біогазу. В середній частині реактора скупчується рідина, а нижня грязеподібна фракція випадає в осад. Метаноутворюючі бактерії найбільш активні в середній зоні. Тому для оптимізації умов метаногенезу та підвищення виходу біогазу біомасу в реакторі потрібно періодично перемішувати (мінімум раз на добу, а бажано до шести разів).

Для перемішування використовуються різні механічні та гідравлічні змішувальні пристрої, а також біогаз, який подається в реактор компресором. Швидкість руху біомаси при перемішуванні не повинна перевищувати 0,5 м/сек. За більш високих швидкостей проходить розрив оболонки мікробних клітин.

③ При утилізації біомаси будь-якого походження шляхом анаеробної ферментації утворюються такі фракції:

- 1) біогаз (суміш газів);
- 2) нерозщеплені мікроорганізмами органічні речовини (тверда фракція або шлам) вологістю 65-70%;
- 3) рідка фракція або надосадова рідина.

Біогаз, утворений у ферментаційній камері, як більш легкий, накопичується над масою звідки трубопроводами відводиться у газовий резервуар (газхолдер).

*Біогаз* – це суміш газів, яка складається з метану (50-85%), діоксиду вуглецю (15-50%), невеликої кількості сірководню (до 2 %), а також домішок водню, аміаку, оксидів азоту. Присутність діоксиду вуглецю обмежує теплоутворюючу здатність біогазу як палива, що залежно від співвідношення  $\text{CH}_4/\text{CO}_2$  досягає 17,8-33,4 МДж/м<sup>3</sup>.

Енергетична цінність 1 м<sup>3</sup> біогазу, який складається на 50% з метану, досягає 17,8 МДж, а при збільшенні вмісту метану до 70 %, його енергетичний потенціал підвищується до 25 МДж. Енергетична цінність таких традиційних енергоносіїв, як природний газ і рідке паливо, з розрахунку на 1 м<sup>3</sup> і 1 кг складає 34 і 42 МДж відповідно.

1 м<sup>3</sup> біогазу еквівалентний енергії, яка міститься в: 0,65 м<sup>3</sup> природного газу, 0,7 л нафти, 0,65 л дизпального, 0,64 л бензину, 0,6 л гасу (керосину), 3,5 кг дров та 1,5 кг кам'яного вугілля.

Поділ біомаси після зброджування на тверду і рідку фракції можна проводити за допомогою центрифуги або віброгрохоту.

Тверда фракція гною або шлам містить значну кількість поживних речовин і може використовуватись як цінне знешкоджене органічне добриво або білкові і вітамінні кормові добавки. Він не має специфічного запаху.

Анаеробна ферментація гнойової біомаси супроводжується зменшенням у шлам майже на 50 % сухої органічної речовини порівняно з вихідним гноем за

рахунок включення 10-15% вуглецю субстрату в мікробну масу, а також у такі компоненти біогазу, як метан і діоксид вуглецю.

Шлам є цінним органічним, азотним і мінеральним добривом, в якому поживні речовини знаходяться в більш доступній формі. При анаеробному зброджуванні зберігаються необхідні для рослин біогенні елементи (N, P, K), натомість при компостуванні їх втрати складають до 40 %.

Рідка фракція, як і шлам, не має специфічного запаху і містить органічних речовин на 80% менше, а її біологічна потреба в кисні на 80% нижча, ніж до анаеробної ферментації. Санітарно-гігієнічні показники надосадової рідини дозволяють її зливати у каналізаційну мережу або водоймища. Але це нераціонально, тому що вона містить значну кількість поживних речовин і може використовуватись як рідке органічне добриво. Рідка фракція гною містить в середньому 1,0-5,0% сухої речовини з рН – 6,5-8,3. Крім того, рідка фракція може бути субстратом для вирощування мікрободоростей.

У середньому з 1 кг органічної речовини, біологічно розкладеної на 70%, можна одержати 0,5 кг біогазу, 0,2 кг води і 0,3 кг нерозщепленого залишку або шламу.

④ За принципом дії усі БГУ можна розподілити на три основних види:

БГУ безперервної дії або проточні БГУ. В них гній безперервно або з короткими інтервалами подається у постійно заповнений реактор, в якому оптимальні умови анаеробного розщеплення створюються механічним перемішуванням і підігріванням маси. Свіжий матеріал надходить у верхню частину камери, а відводиться з нижньої частини (над дном камери). При кожному завантаженні об'єм свіжого гною має відповідати об'єму гною, який перебродив і вивантажується. Така технологічна схема забезпечує найбільшу продуктивність БГУ і за нею працює основна частина вітчизняних і зарубіжних установок, які сьогодні експлуатуються. Ця технологія потребує найменших

ферментаційних камер, які можуть встановлюватися горизонтально або вертикально.

Однак вони мають певні недоліки. В установках проточного типу при підвищенні проходження вихідного гною через реактор відбувається винесення колоній метаноутворюючих мікроорганізмів, що у свою чергу призводить до зменшення виходу біогазу. Для усунення цього недоліку в установках проточного типу необхідно використовувати системи автоматичного керування процесом, які могли б виявити відхилення в технологічному процесі, ліквідувати їх, а також підтримувати оптимальні параметри процесу біометаногенезу.

#### БГУ з періодичною або циклічною системою використання метантенків.

Переробка гною в них проводиться у послідовно з'єднаних метантенках (2-х або більше), які по чергово заповнюються свіжою гнойовою біомасою. Чим більше реакторів, тим коротші перерви між циклами виробництва біогазу. Особливістю експлуатації установок є неповне видалення з реактора шламу, який відіграє роль затравки. Завдяки цьому уже через кілька діб після заповнення бродильної камери свіжим гноєм розпочинається метаногенез.

Використання об'єму бродильних камер при цій системі менш ефективне. Періодичність у заповненні реакторів викликає необхідність мати достатній запас гною, що потребує будівництво гноєсховищ. Крім цього, щоб під час вивантаження шламу в реактор не потрапило повітря, тобто, щоб не відбувалося розгерметизації реактора, його потрібно заповнювати біогазом із додаткових, спеціально призначених для цього ємностей (газозбірників).

БГУ з накопичувальною системою. В них один і той самий резервуар є одночасно реактором і ємністю для зберігання шламу, аж до вивезення його на поля. Ця система має ще й іншу назву акумулювальна або басейнова. Вона мало застосовується для виробництва біогазу.



***Питання для контролю:***

1. Надайте загальну характеристику біометаногенезу.
2. Що таке та з чого складаються біогазові установки?
3. Охарактеризуйте біогаз та яка його цінність?
4. Як використовують тверду і рідку фракції по закінченню біометаногенезу?
5. Як функціонують біогазові установки безперервної дії?
6. Поясніть принцип дії біогазових установок з циклічною системою використання метантенків.

## Література

1. Алмагамбетов К. Х. Биотехнология микроорганизмов / К. Х. Алмагамбетов. – Астана, 2008. – 244 с.
2. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А. М. Безбородов – М. : Агропромиздат, 1991. – 238 с.
3. Буценко Л. М. Біотехнологічні методи захисту рослин : конспект лекцій для студ. спец. 8.05140105 «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» ден. та заоч. Форм навчання / Л. М. Буценко. – К. : НУХТ, 2013. – 95 с.
4. Буценко Л. М. Технології біопрепаратів для ветеринарії і сільського господарства : конспект лекцій для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Л. М. Буценко, А. Д. Конон. – К. : НУХТ, 2014. – 106 с.
5. Вакцины [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : <http://medlec.org/lek2-63116.html>. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
6. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения РАН, 1999. – 252 с.
7. ДНК-вакцина [Електронний ресурс] // Вікіпедія : вільна енциклопедія. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : <https://uk.wikipedia.org/wiki/ДНК-вакцина>. – Дата останньої правки : 8.02.2017. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
8. Евтушенков А. Н. Введение в биотехнологию : курс лекций / А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. – Мн. : БГУ, 2002. – 105 с.
9. Завертяев Б. Н. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота Б. Н. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.

10. Инактивированные вакцины. Корпускулярные вакцины. Компонентные вакцины. [Электронный ресурс]. – Электрон. текст. дані. – Режим доступу : <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/294.html>. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
11. Капацитация у сперматозоидов. Акросомная реакция и профилактика полиспермии [Электронный ресурс]. – Электрон. текст. дані. – Режим доступу : <http://dommedika.com/physiology/49.html>. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
12. Клонирование (биология) [Электронный ресурс] // Вікіпедія : вільна енциклопедія. – Электрон. текст. дані. – Режим доступу : [https://ru.wikipedia.org/wiki/Клонирование\\_\(биология\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/Клонирование_(биология)). – Дата останньої правки : 27.03.2017. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
13. Красінько В. О. Біоенергетика та охорона довкілля : конспект лекцій для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К. : НУХТ, 2013. – 88 с.
14. Отримання трансгенних тварин [Электронный ресурс]. – Электрон. текст. дані. – Режим доступу : [http://ua-referat.com/Отримання\\_трансгенних\\_тварин](http://ua-referat.com/Отримання_трансгенних_тварин). – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
15. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
16. Противовирусные вакцины. Типы вакцин [Электронный ресурс]. – Электрон. текст. дані. – Режим доступу : <http://www.studfiles.ru/preview/4659026/>. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
17. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 2008. – 710 с.
18. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль. – Миколаїв : Миколаївський ДАУ, 2011. – 380 с.

Навчальне видання

**Сметана Олександр Юрійович**

# **Сільськогосподарська біотехнологія**

*курс лекцій*

Технічний редактор: О. Ю. Сметана

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 8,25

Тираж 20 прим. Зам. № \_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.