

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ И ЖИВОТНОВОДСТВЕ

краткий курс лекций

для бакалавров III курса

Направление подготовки
19.03.01 Биотехнология

Профиль подготовки
Биотехнология

Саратов 2016

УДК 575
ББК 30
Ф28

Рецензенты:

Заведующая кафедрой «Экология», доктор биологических наук,
профессор ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени
Гагарина Ю.А.»

Е.И. Тихомирова

Доцент кафедры «Кормление, зоогигиена и аквакультура»,
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ

Л.А. Сивохина

Биотехнология в растениеводстве и животноводстве: краткий курс лекций для студентов III курса направления подготовки 19.03.01 Биотехнология /
Ф28 Сост.: Е.А. Фауст // ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. – Саратов, 2016. – 76 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биотехнология в растениеводстве и животноводстве» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для студентов направления подготовки 19.03.01 Биотехнология. Краткий курс лекций содержит теоретический материал по основным вопросам биотехнологии в области животноводства и растениеводства; рассмотрены биотехнологические методы, приемы и средства производства продукции растениеводства и животноводства. Направлен на формирование у студентов знаний о роли, значении и месте биотехнологии в усовершенствовании методов производства продукции растениеводства и животноводства.

УДК 575
ББК 30

© Фауст Е.А., 2016
© ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, 2016

Введение

В настоящее время биотехнология приобретает все более важную роль в повышении доходности производства продукции животноводства и растениеводства.

В области животноводства используются следующие биотехнологические разработки, приемы, методы и средства: диагностика, профилактика и лечение заболеваний с использованием техники моноклональных антител; генетическое улучшение пород животных; искусственное осеменение; силосование кормов; утилизация отходов животноводческих ферм; получение экологически чистых органических удобрений на основе переработки отходов животноводства. Некоторые вещества, полученные с помощью микроорганизмов, могут использоваться в виде кормовых добавок, другие – подавляют вредную микрофлору в желудочно-кишечном тракте или стимулируют образование специфических микробных метаболитов и др.

В области растениеводства биотехнология занимается выведением сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; разработкой биологических средств борьбы с сорняками, грызунами, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами; получением бактериальных удобрений; разработкой микробиологических методов рекультивации почв; получением трансгенных растений; переработкой отходов и побочных продуктов растениеводства.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биотехнология в растениеводстве и животноводстве» раскрывает основные направления биотехнологии в области растениеводства и животноводства, на которых базируются ее современные аспекты и особенности их использования в профессиональной деятельности. Курс нацелен на формирование у студентов навыков выбора биотехнологических методов, приемов и средств для более рационального ведения сельского хозяйства.

Лекция 1

ВВЕДЕНИЕ В ДИСЦИПЛИНУ. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

1.1. Значение биотехнологии для растениеводства и животноводства

Биотехнология – это совокупность промышленных методов, в которых используют живые организмы и биологические процессы для производства различных продуктов.

В области растениеводства биотехнология занимается следующими разработками: выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; разработка биологических средств борьбы с сорняками, грызунами, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами; получение бактериальных удобрений; разработка микробиологических методов рекультивации почв; получение трансгенных растений; переработка отходов и побочных продуктов растениеводства.

Для животноводства биотехнология предлагает следующие разработки: получение трансгенных животных с новыми или усиленными свойствами и признаками; размножение животных путем клонирования; трансплантация эмбрионов; получение лекарственных и диагностических препаратов; переработка отходов и побочных продуктов животноводства; создание кормовых средств из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства.

1.2. Почвенная биотехнология: краткая история развития

Почвенная биотехнология изучает роль флоры и фауны в трансформации различных субстратов в ценные конечные биологически активные соединения, которые являются источниками питания ауто- и гетеротрофов; разрабатывает приемы регуляции биотехнологических процессов для оптимального получения целевого продукта.

В истории развития почвенной биотехнологии можно выделить следующие важные этапы:

1763 г. – М.В. Ломоносов в труде «О слоях земных» писал, что почвообразовательный процесс – результат длительного взаимодействия растительности с горными породами.

1846 - 1903 г.г. – В.В. Докучаевым разработано понятие о почве как естественном историческом теле, которое обладает свойствами живой и неживой природы. Он создал учение о географических зонах, разработал научную классификацию почв и развил агрогеологическое направление, которое рассматривало почву как геологическое образование.

1845 - 1895 г.г. – П.А. Костычев создал и развил агрономическое направление почвоведения, т.е. взаимоотношение почвы и растительности, почвенное плодородие; организовал первую в России агрохимическую лабораторию.

1860 - 1927 г.г. – М.Н. Сибирцев, К.Д. Глинка и др. разрабатывали географическое направление, т.е. сравнительный анализ почв, их профиль в связи с почвообразованием.

1872 - 1932 г.г. – К.К. Гедройц заложил основы коллоидной химии почв.

1863 - 1945 г.г. – В.И. Вернадский, А.П. Виноградов и В.Р. Вильямс разрабатывали биогеохимическое направление, т.е. роль живых организмов в жизни почвы.

В последнее время много внимания уделяется агробиологической концепции земледелия. Большой вклад в развитие этого направления внесли Е.Н. Мишустин, М.М. Ко-

нонова, Д.Г. Звягинцев, В.Т. Емцев, Д.И. Никитин, Н.А. Красильников и др.

1.3. Физико-химическая характеристика почвы

Обычно в почвах для большинства культур микроэлементов достаточно. Из почвы растения извлекают азот, фосфор и калий, в меньших количествах серу, бор, магний и другие элементы. Содержание азота и фосфора зависит от количества в почве гумуса, а калия – от состава минеральной части почвы.

Растениям, в основном, доступны только вещества, которые растворимые в воде и слабых кислотах.

В почве меньше, чем в атмосфере кислорода (12 - 14 %), но больше углекислого газа (6 - 8 %). Она содержит метан, углеводороды, сероводород, жирные кислоты и продукты неполного окисления органических веществ.

Почва обладает радиоактивностью.

Ферменты почвы действуют в адсорбированной или иммобилизованной форме. Их активность мало исследована, т.к. она зависит от природы и свойств адсорбентов, условий среды, длительности контакта фермента и носителя и т.д.

Кислотность почвы – один из хорошо изученных показателей. В кислой почве мало доступных растениям фосфора, бора, алюминия, марганца и др. Кислый почвенный раствор разрушает структуру почвы, ее рыхлость, водовоздушный режим и др. На таких почвах плохо размножаются полезные микроорганизмы; у большинства растений плохо растут и ветвятся корни; увеличивается кислотность соков в растениях, т.е. нарушается обмен веществ.

Ведущий признак почвообразовательного процесса – образование перегноя (гумуса). Гумус составляет 85 - 90 % всей массы органического вещества почвы. В нем много азота, фосфора и других элементов. Гумус представляет собой группу высокомолекулярных соединений, химическая природа которых еще точно не установлена.

В нем выделяют четыре группы соединений:

Гуминовые кислоты составляют 15 - 40 % гумуса. Они образуются при разложении отмерших растений при участии микроорганизмов, влаги и кислорода атмосферы. По химической структуре гуминовые кислоты представляют собой конденсированные ароматические соединения, в которых обнаружены фенольные гидроксилы, карбоксильные, карбонильные и ацетогруппы. В кислотном гидролизате гуминовых кислот определяются аминокислоты, амиды, пуриновые и пиримидиновые основания. Молекулярная масса гуминовых кислот составляет 1300-1500.

Гумины составляют 20 - 30 % гумуса. К ним относят те соединения гумуса, которые не извлекаются из почвы щелочными растворами. Считают, что это производные гуминовых кислот, прочно связанные с минеральной частью почвы.

Гиматомелановые кислоты являются спирторастворимой фракцией гуминовых кислот.

Фульвокислоты составляют 35 - 50 % гумуса. По строению близки к гуминовым кислотам, но имеют менее конденсированное ароматическое кольцо, небольшую молекулярную массу, большее число разнообразных функциональных групп, обладают восстанавливающими свойствами, образуют комплексные растворимые соединения с железом, алюминием, кальцием и т.д.

1.4. Микрофлора почвы

Важную роль в образовании гумуса и его использовании играют почвенные микроорганизмы. Считают, что примерно 0,1 - 2,5 % почвенного органического вещества состоит из клеток разных микроорганизмов.

Они формируют структурные компоненты гумусовых веществ следующим образом: при разложении растительных остатков; выделяют структурные вещества в процессе жизнедеятельности; при отмирании поставляют в почву большое количество органической массы.

В почве обитают:

Бактерии – образуют три класса:

1. *Eubacteriae*. Среди них выделяют: сапрофиты-аутотрофы – они используют для питания различные минеральные соединения (CO_2 , соли аммония, соли железа и др.); сапрофиты-метатрофы – они используют для питания различные относительно простые органические соединения; паратрофы – они используют для питания сложные высокомолекулярные органические соединения.

Некоторые представители этого класса бактерий выполняют разнообразные физиологические функции: нитрификацию, азотфиксацию, метанообразование, окисление сульфатов в серу, потребление фенола и т.д.

2. *Actinomycetas*. Большинство бактерий этого класса является аэробами и мезофилами. Принимают участие в синтезе органических и минеральных веществ.

3. *Mycobacteriae* разлагают клетчатку и хитин, выделяют большое количество слизи, которая может превращаться в гумусоподобное вещество.

Грибы участвуют в образовании перегноя, выделяют в почву минеральные соединения, т.к. разлагают остатки растений и других органических веществ.

Водоросли обильно населяют почву, если в ней содержится большое количество растворимых соединений азота; могут заселять субстраты, непригодные для других организмов.

Простейшие – ими богаты окультуренные почвы (от 500 до 500 тыс. в 1 г почвы).

Вирусы и бактериофаги – их роль изучена недостаточно.

Распределение бактерий в почве зависит от географического расположения; глубины; механического и агрегатного состояния почвы; времени года; водного и солевого режима; температуры; pH; экологического состояния; применения минеральных удобрений; наличия антибиотиков, фитонцидов, бактериофагов; типа растительности.

Большинство бактерий почвы развиваются при нейтральном pH, температуре 25 - 45 °C, при относительной влажности выше 95 %. На глубине 3 - 4 м почва почти стерильна.

Важное значение в повышении урожайности растений и улучшении плодородия почвы имеют *микробы-антагонисты*. Это бактерии, грибы, дрожжи и пр., которые вырабатывают антибиотические вещества. Они подавляют рост и развитие патогенной микрофлоры; оздоравливают почву; препятствуют болезням растений; способствуют усвоению растениями антибиотических веществ; усиливают иммунобиологические свойства растений и др.

В зависимости от микробиологических свойств почвы классифицируют следующим образом:

Болезнетворные почвы. В них 5 - 20 % составляют микроорганизмы типа *Fusarium*. После внесения органики с большим содержанием азота в них образуются продукты неполного окисления, которые токсичны для растений. В них большое количество

энергии теряется на газообразование.

Почвы, подавляющие болезни. Их микрофлора (*Trichoderma*, *Aspergillus* и *Streptomyces*) продуцирует большое количество антибиотиков. Зерновые культуры, выращенные на этих почвах, редко повреждаются вредителями или болезнями. Такие почвы имеют высокую проницаемость для воздуха или воды.

Ферментативные почвы (зимогеники). В них легко осуществляются различные виды ферментации. Они имеют приятный аромат, благоприятные физические свойства, в ней содержится много БАВ и мало метана, аммиака и диоксида углерода.

Синтезирующие почвы содержат значительное число микроорганизмов, которые регулируют содержание атмосферного азота и углекислоты в почве. Они даже при небольших количествах органики, но при достаточной влажности способны поддерживать хорошее плодородие почвы.

1.5. Механизм действия почвенных микроорганизмов

Основные механизмы стимуляции роста растений микроорганизмами следующие: фиксация атмосферного азота; перевод органических соединений гумуса в вещества, которые могут усваиваться растениями; синтез фитогормонов; подавление роста фитопатогенных микроорганизмов.

Азотфиксация (диазотрофность) – это связывание азота атмосферы и перевод его в азотсодержащие соединения микроорганизмами или цианобактериями.

Азот – обязательный компонент аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, из которых затем синтезируются белки и нуклеиновые кислоты. Растения, как правило, в качестве единственного источника азота могут использовать аммиак или растворимые нитраты. В почве очень мало растворимых неорганических солей азота, т.е. все живые системы зависят от атмосферного азота организмов, способных его усваивать и фиксировать. Так, азотфиксирующие бактерии живут в качестве симбионтов в корневых клубеньках бобовых растений.

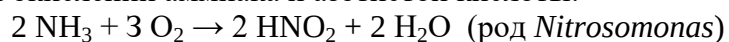
Хемосинтез открыт крупным отечественным ученым С.Н. Виноградским. Это процесс усвоения диоксида углерода и синтеза органических веществ за счет энергии, которая выделяется при химических реакциях окисления неорганических соединений. Он протекает у микроорганизмов, которые не содержат хлорофилла.

К ним относятся:

Серные бактерии (род *Thiobacillus*) – они получают энергию для синтеза органических веществ при окислении сероводорода: $2 \text{H}_2\text{S} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{S}_2$.

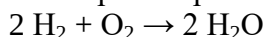
Далее при окислении серы, выделяется энергия, которая используется для биосинтезов: $\text{S}_2 + 3 \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{SO}_4$.

Нитрифицирующие бактерии – они получают энергию для биосинтеза органических веществ при окислении аммиака и азотистой кислоты:



Денитрифицирующие бактерии (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacterium stutzeri* и др.) – восстанавливают нитраты с образованием N_2 или N_2O . Денитрификация происходит в тех участках почвы, где недостаточно кислорода.

Водородные бактерии – получают энергию при окислении водорода:



Хемосинтезирующие бактерии – окисляют оксиды железа (II) и марганца (II) в трехвалентные соединения этих металлов.

Аммонификация – это распад белково-азотистых соединений растительных и животных остатков с образованием аммиака под действием бактерий, актиномицетов, грибов и др.

Фосфор, наряду с азотом, является лимитирующим элементом питания растений. Процесс мобилизации фосфора из трудноподвижных фосфатов (нуклеиновых кислот, нуклеопротеинов, перегнойных соединений) осуществляют разные микроорганизмы-кислотообразователи.

Моно- и полисахариды легко распадаются под влиянием ферментов целлюлозоразрушающих микроорганизмов (микобактерии родов *Polyangium*, *Mycococcus*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*; грибы родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*; актиномицеты). При этом образуется вода, диоксид углерода, органические кислоты, спирты, альдегиды и др.

Медленно разлагаются в почве лигнины. Это высокомолекулярные соединения, продукты конденсации оксикониферилового спирта. В древесине их содержится до 30 %. Разрушают лигнин бактерии из родов *Achromobacter*, *Pseudomonas*, некоторые грибы и актиномицеты.

В процессе жизнедеятельности микроорганизмы почвы синтезируют биологически активные вещества: витамины (никотиновую кислоту, рибофлавин, биотин, пантотеновую кислоту, витамин В₁₂ и др.) и ауксины. Водорастворимые витамины являются коферментами ферментов. Поэтому насыщение витаминами ферментных систем повышает их каталитическую активность. Это стимулирует реакции метаболизма, а значит, и роста растений.

Регулировать биотехнологические процессы с участием микрофлоры почвы можно следующими приемами:

- направленное воздействие на микробный ценоз почв для стимуляции роста и размножения органически ценных ассоциаций микроорганизмов, способных к синтезу различных БАВ;
- введение севооборотов и чередование культур, оказывающих позитивное действие на микробиологические процессы и повышающие плодородие почвы;
- регулирование микробиологических процессов путем внесения удобрений, почвоудобренных микробных препаратов, рациональной мелиорации.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое биотехнология?
- 2) Сформулируйте цель и задачи биотехнологии в области животноводства.
- 3) Сформулируйте цель и задачи биотехнологии в области растениеводства.
- 4) Чем занимается почвенная биотехнология?
- 5) Каковы основные этапы развития почвенной биотехнологии?
- 6) Охарактеризуйте основные физико-химические параметры почвы.
- 7) Что собой представляет гумус?
- 8) Каким образом почвенная микрофлора формирует гумус?
- 9) Какие группы бактерий обитают в почве? Охарактеризуйте их.
- 10) От каких факторов зависит распределение бактерий в почве?
- 11) Какова роль микробов-антагонистов в улучшении плодородия почвы?
- 12) Как классифицируют почвы в зависимости от их микробиологических свойств?
- 13) Каковы основные механизмы стимуляции роста растений микроорганизмами?
- 14) Что такое азотфиксация?
- 15) Что такое хемосинтез?

- 16) Что такое аммонификация?
- 17) Какие приемы можно использовать для регулирования биотехнологических процессов с участием микрофлоры почвы?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
3. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
4. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

Дополнительная

1. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493-1236-2
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. **Блинов, В.А.** ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.
5. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
6. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
7. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 2

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

2.1. Общие сведения об удобрениях

Удобрения – это вещества, которые улучшают питание растений и свойства почвы.

В настоящее время единой классификации удобрений нет.

Выделяют: 1) *минеральные удобрения* – азотные, фосфорные, калийные, магниевые, молибденовые и т.д.; 2) *органические* – навоз, компосты, торф, зеленые удобрения и др.

По агрономическому назначению удобрения делят на: 1) *прямые* – их применяют из-за содержащихся в них питательных веществ, необходимых растениям (азотные, фосфорные, навоз, компосты и др.); 2) *косвенные* – это вещества, которые используют для улучшения свойств почвы (например, известь – для ликвидации излишней кислотности почв).

Ежегодно во всем мире в почву в виде минеральных удобрений вносится около 60 млн. т азота, фосфора, калия. Они накапливаются в почве и грунтовых водах, отрицательно влияют на состояние микробного сообщества почвы, вызывают потерю гумуса, нитратное загрязнение кормов и продуктов питания, рост онкологических заболеваний животных и человека.

Альтернативой химизации сельского хозяйства являются естественные, биологические технологии. В этом отношении перспективным является использование микробных земледобрильных препаратов, или бактериальных удобрений.

Бактериальные удобрения содержат монокультуру или комплекс микроорганизмов, которые способствуют накоплению в почве элементов питания растений, стимулируют их рост и развитие, обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам.

Преимущества бактериальных удобрений перед химическими средствами: поддержание и сохранение окружающей среды; получение экологически чистой продукции; сохранение всех взаимосвязей и цепей биосферы, созданных природой; биологизация земледелия; восстановление плодородия почвы и пр.

В 1888 г. М. Бейеринк выделил чистую культуру клубеньковых бактерий *Rhizobium* бобовых растений. После этого стали производиться первые микробные земледобрильные препараты.

2.2. Виды бактериальных удобрений

В настоящее время известны следующие бактериальные удобрения:

- препараты на основе симбиотических азотфиксирующих бактерий (нитрагин, ризоторфин)
- препараты на основе несимбиотических азотфиксирующих бактерий (флавобактерин, ризоэнтерин, агрофил, ризоагрин, азотобактерин, ризобактерин, экстракол и др.)
- фосфобактерин
- биологически активный грунт АМБ
- грибы-микоризообразователи

Нитрагин и ризоторфин производятся на основе активных жизнеспособных бак-

терий из рода *Rhizobium*. Они усваивают азот атмосферы и переводят его в связанную форму, которая доступна для питания растений. Растения снабжают бактерии энергией, которая необходима для фиксации азота. Таким образом, возникает симбиоз бактерий и бобовых культур. Это обеспечивает благоприятные условия азотного питания и повышение урожайности. Фиксация атмосферного азота возможна только в клубеньках, которые образуются на корнях растений.

Выпускается два вида нитрагина – почвенный и сухой.

Почвенный нитрагин впервые был получен в 1911 году на бактериально-агрономической станции в Москве. В настоящее время его производство ограничено из-за сложной и трудоемкой технологии.

Более перспективен сухой нитрагин. Это высушенная биомасса жизнеспособных бактерий в смеси с наполнителем (тиомочевина и меласса).

При использовании нитрагина повышается урожайность бобовых растений – на 15-20%, в растениях увеличивается содержание белка – на 3-5%.

В 1973-1977 г.г. была создана технология торфяного препарата клубеньковых бактерий – ризоторфина. При этом торф сушат, размалывают в порошок, нейтрализуют мелом, стерилизуют облучением гамма-лучами, увлажняют до 30-40% и расфасовывают в полиэтиленовые пакеты. Затем его облучают и заражают клубеньковыми бактериями с помощью шприца. Ризоторфином обрабатывают семена бобовых культур (гороха, люпина, сои, люцерны, клевера и др. при посеве).

Флавобактерин и **ризозэнтерин** усиливают поглотительную способность корней, что улучшает минеральный и водный обмен растений, стимулирует рост растений, являются антагонистами микроорганизмов-фитопатогенов. Повышают в продукции содержание сырого белка – на 1,5-2%, аскорбионовой кислоты – на 15-20%.

Азотобактерин – бактериальное удобрение, содержащее свободно-живущий почвенный микроорганизм азотобактер – *Azotobacter chroococcum*. Азотобактер способен усваивать до 10-15 кг атмосферного азота в год на 1 га пахотного слоя земли. Большое количество белкового азота появляется в почве при отмирании бактерий.

Эти бактерии выделяют биологически активные вещества (никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин и др.), которые стимулируют рост растений; фунгицидные вещества, которые угнетают развитие некоторых нежелательных микроскопических грибов в ризосфере растения.

Азотобактер способствует поступлению в растения соединений фосфора; стимулирует развитие почвенной микрофлоры, которая необходима для корневого питания; он использует корневые выделения, продукты распада растительных остатков и соединений образующихся в результате минерализации перегноя в качестве дополнительного источника углерода и энергии.

Выпускается несколько видов азотобактерина: сухой, почвенный и торфяной.

Сухой азотобактерин – это активная культура высушенных клеток азотобактера с наполнителем. В 1 г препарата содержится не менее 0,5 млрд. жизнеспособных клеток.

Почвенный и торфяной азотобактерин представляют собой активную культуру азотобактера, размноженную на твердой питательной среде. В 1 г содержится не менее 50 млн. жизнеспособных клеток.

Азотобактерин применяют для обработки семян, рассады, компостов. При этом урожайность увеличивается на 10-15%.

Ризобактерин – создан на основе штамма *Klebsiella planticola* S. Он обладает высокой азотфиксирующей активностью, продуцирует β-индолилуксусную кислоту и по-

давляет развитие корневых фитопатогенов Ризобактерин повышает урожайность зерновых культур в среднем на 23%.

Экстрасол – содержит индивидуальные штаммы или несколько видов ризосферных азотфиксирующих бактерий и их метаболиты, которые предназначены для данного вида или сорта растений, что определяется экспериментальным путем. Представляет собой сухую или увлажненную массу или бактериальную суспензию. В 1 г содержится не менее 100 млн. бактериальных клеток.

Экстрасол улучшает поступление элементов питания в растения, увеличивает энергию прорастания семян, ускоряет развитие растений, снижает поражаемость растений фитопатогенными микроорганизмами.

Несимбиотическую азотфиксацию можно усилить внесением в почву ассоциативных азотфиксирующих бактерий и микоризных грибов; цианобактерий и водного папоротника.

Фосфобактерин – порошок светло-серого или желтоватого цвета, содержит споры капустной палочки *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*.

Эти бактерии превращают сложные фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды и т.д.) и трудноусвояемые минеральные фосфаты в доступную для растений форму; вырабатывают биологически активные вещества (тиамин, пиридоксин, биотин, пантотеновую и никотиновую кислоты и др.), стимулирующие рост растения.

Фосфобактерин эффективен на богатых органикой почвах и благоприятно действует на корневую систему, его рекомендуют для улучшения роста кустарников и древесных растений.

Биологически активный грунт АМБ (автохронная микрофлора «Б») используется при создании грунта в теплицах и парниках для выращивания овощных культур и рассады, а также для активации биохимических процессов северных почв (автохронная микрофлора «Б»). В АМБ входят бактерии разлагающие белки и белково-подобные соединения, фосфорсодержащие органические соединения, целлюлозолитические, азотфиксирующие, нитрифицирующие бактерии и др.

Технология удобрения АМБ сложная и громоздкая. При этом в кислый торф вносят известковый материал, минеральные добавки и маточную культуру АМБ из расчета 1-2 кг/т, затем идет созревание грунта на местах его использования. Расход АМБ – до 500 кг/т.

Грибы-микоризообразователи улучшают водообеспечение и минеральное питание растений, продуцируют биологически активные вещества (витамины, фитогормоны, антибиотики), противостоят фитопатогенным микроорганизмам. Так, полевые культуры образуют нормальную микоризу самостоятельно. Микоризация используется при инокуляции семян и саженцев древесных пород. Грибы-микоризообразователи трудно культивировать искусственно, поэтому для микоризации чаще применяют лесную почву, которая содержит споры и мицелий таких грибов.

2.3. Гормоны растений (фитогормоны)

Растительные гормоны, или фитогормоны – это химические вещества, вырабатываемые в растениях и регулирующие их рост и развитие

Имеют следующие особенности: эндогенное происхождение – образуются из органических кислот, в частности, из аминокислот; действуют не только в местах образова-

ния, но и на расстоянии от них, т.е. транспортируются по растениям; действуют в малых концентрациях.

Фитогормоны менее специфичны, чем гормоны животных, проявляют однотипное действие на одни и те же метаболические процессы: растяжение клеток или подавление их роста за счет торможения ионного транспорта; влияние на синтез ферментов и их активность; изменение проницаемости мембран растительных клеток; активация или ингибирование процессов биосинтеза РНК и белка.

В настоящее время известно семь групп фитогормонов: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, этилен, брассиностероиды, фузикоцины.

Ауксины были открыты в 20-е годы XX века как фактор тропизмов растений. Химическая природа – индолил-3-уксусная кислота (ИУК). Стимулируют образование корневой системы у черенков, применяют при выращивании плодовых деревьев – для удаления избыточных завязей, при выращивании зерновых культур – для уничтожения сорняков.

Гиббереллины были открыты в 1926 г. В 1938 г. в Японии они были выделены как продукты патогенного гриба *Gibberella fujicuroi*, которые вызывают чрезмерный вегетативный рост риса. Химическая природа – дитерпеноиды, состоящие из четырех изопреновых остатков. Известно около 70 представителей, в т.ч. 45 – выделены из растений. Применяют для повышения урожайности некоторых сортов винограда, для защиты ягод от фитопатогенных грибов. Способны выводить семена и клубни из состояния покоя.

Цитокинины были открыты в 1955 г. как факторы, стимулирующие деление клеток. Известно 13 представителей. Химическая природа – производные 6-аминопурина. Задерживают старение листьев, регулируют формирование хлоропластов, повышают устойчивость клеток растений к неблагоприятным воздействиям (повреждающим температурам, недостатку воды, повышенной засоленности, рентгеновскому излучению, воздействию пестицидов). Способны выводить семена и клубни из состояния покоя.

Этилен – бесцветный газ, растворимый в воде. В 1901 г. Д.Н. Нелюбов из Петербургского университета сообщил о том, что этилен, входящий в состав светильного газа, стимулирует опадение листьев и нарушает фототропизм проростков гороха. В 1934 г. этилен был обнаружен в газообразных выделениях хранящихся яблок. Это послужило основанием для того, чтобы считать его фитогормоном. Его синтезируют грибы и высшие растения. По мере старения тканей синтез этилена увеличивается. Этот гормон стимулирует процессы опадания листьев и плодов. Этилен и его производные применяют для ускоренного созревания плодов. Разработан препарат *э с т р е л*, который при попадании в растение выделяет этилен. Эстрел применяют для регуляции созревания томатов, вишен и других овощей и фруктов. Стимулирует образование абсцизовой кислоты.

Абсцизовая кислота (АБК) выделена в 1964 г. из молодых коробочек хлопчатника. Химическая природа – секвитерпен, синтезируется из мевалоновой кислоты во всех органах растений. Является антагонистом других фитогормонов. Обладает мощным ингибиторным действием – ускоряют распад нуклеиновых кислот, белков, хлорофилла. Иницирует синтез стрессовых белков. Они ответственны за обезвоживание семян, что обеспечивает их покой.

Брассиностероиды. Химическая природы – стероиды. Регулирует рост семечки, стимулирует ее развитие и образование семян; стимулируют устойчивость к стрессам и грибным заболеваниям.

Фузикоцины. Химическая природа – стероиды. Выводит семена из состояния покоя, ускоряет их прорастание.

Фитогормоны активно влияют на синтез, распад и транспорт друг друга. Поэтому изменение уровня одного фитогормона приводит к изменению всех фитогормональной системы.

2.4. Фиторегуляторы

Фиторегуляторы – это природные и синтетически препараты, которые вызывают различные ростовые или формативные эффекты и не обладают действием удобрений и гербицидов. Известно около 5 тыс. соединений, которые обладают регуляторной активностью, однако в практике применяется лишь несколько десятков (около 1%).

Фиторегуляторы регулируют: дифференцировку клеток; клеточные деления; образование новых тканей и органов; темпы роста и развития растений; продуктивность растений; качество урожая.

Фиторегуляторы влияют на фитогормональную систему растений следующим образом: повышение уровня фитогормона при введении извне его аналога; стимулирование или подавление биосинтеза фитогормона; блокирование транспорта фитогормона; стимулирование или подавление системы инактивации фитогормона; конкуренция за присоединение к рецептору фитогормона; инактивация фитогормонрецепторного комплекса.

В сельском хозяйстве и биотехнологии растений применяют синтетические регуляторы – аналоги и антагонисты всех групп фитогормонов. Некоторые регуляторы могут вызывать нарушения хромосом. Такие препараты нельзя использовать в промышленном масштабе в целях сохранения генофонда растений.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Преимущества бактериальных удобрений перед химическими средствами повышения урожайности растений.
- 2) Какие группы бактериальных удобрений Вам известны?
- 3) Дайте характеристику бактериальных удобрений на основе активных жизнеспособных бактерий из рода *Rhizobium* (нитрагин и ризоторфин).
- 4) Дайте характеристику бактериальных удобрений, содержащих свободно-живущий почвенный микроорганизм азотобактер – *Azotobacter chroococcum* (флавобактерин и ризоэнтерин).
- 5) Дайте характеристику бактериальных удобрений ризобактерина и экстразола.
- 6) Дайте характеристику бактериального удобрения фосфобактерина, содержащего споры капустной палочки *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*.
- 7) Дайте характеристику биологически активного грунта АМБ.
- 8) Какова роль грибов-микоризообразователей в повышении урожайности растений?
- 9) Роль фиторегуляторов в повышении урожайности сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4

3. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
4. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

Дополнительная

1. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493-1236-2
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. **Блинов, В.А.** ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.
5. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
6. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
7. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 3

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

3.1. Химические способы защиты растений

Роль биотехнологии в сохранении генофонда растений заключается в следующем: выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; разработка химических средств борьбы с сорняками, грызунами, насекомыми, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами; разработка биологических средств борьбы с вредителями.

В настоящее время известно около 70 000 различных видов насекомых, которые наносят вред человеку, домашним животным, растениям и материалам. Для защиты животных и растений от вредителей, болезней и сорняков во всем мире используется более 1 000 химических средств – *пестицидов*.

Пестициды должны удовлетворять следующим требованиям: низкая токсичность для человека, домашних животных, полезных растений, насекомых и микроорганизмов при высокой токсичности для конкретных вредителей; стойкость в природных условиях – не более 6 месяцев; не оказывать действие на генетический аппарат человека, животных, полезных насекомых и растений; не обладать канцерогенными свойствами.

В сельском хозяйстве наиболее широко применяются следующие *группы пестицидов*:

Инсектициды – это химические средства уничтожения насекомых-вредителей растений, продуктов, материалов, паразитов и переносчиков заболеваний. По способу действия на насекомых различают: *кишечные инсектициды* – проявляют токсическое действие при попадании в кишечник вредителя; *контактные инсектициды* – убивают насекомых при попадании на наружные покровы (карбофос, дихлофос); *системные инсектициды* – проникают через листья или корни и делают растение токсичным для насекомого.

В 40-х годах XX века было синтезировано множество химических инсектицидов. Самый известный из них – хлорорганическое соединение дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). В 1948 г. П. Мюллер открыл действие ДДТ на насекомых, за что получил Нобелевскую премию. ДДТ оказывает парализующее действие на нервную систему и мышечную ткань насекомых.

Получены фосфорорганические инсектициды – малатион, диазинон. Изначально они были разработаны как боевые отравляющие вещества. Они нарушают функционирование мотонейронов и нейронов мозга насекомых.

В начале 60-х годов XX века было показано, что инсектициды оказывают вредное воздействие на человека, животных и экосистемы: хлорорганические – в большей степени, фосфорорганические – в меньшей степени. Так, ДДТ сохраняется в окружающей среде от 15 до 20 лет и накапливается. Инсектициды аккумулируются в жировых тканях многих организмов.

Инсектициды действуют не избирательно, а уничтожают также и полезных насекомых. В Северной Америке это привело почти к полному истреблению многих видов птиц (бурые пеликаны, ушастые бакланы, белоголовые орланы, сапсаны, ястребы-перепелятники).

Кроме того, со временем основные насекомые-вредители стали более устойчивыми ко многим химическим инсектицидам. Это привело к использованию более высоких концентраций инсектицидов.

Гербициды – химические средства борьбы с сорняками. Выделяют: *гербициды сплошного действия* – уничтожают все виды растений; *гербициды избирательного действия* – уничтожают растения определенных видов.

В каждой из групп выделяют: *контактные гербициды* – они действуют при контакте с наземными частями растений; *системные гербициды* – они попадают внутрь растения при контакте или с почвенным раствором.

Фунгициды – средства для борьбы с грибковыми заболеваниями и болезнями растений.

Репелленты – вещества, которые защищают животных, людей, растения и помещения от нападения насекомых путем их отпугивания.

Аттрактанты – вещества, которые привлекают насекомых.

Регуляторы роста растений. К ним относят: *стимуляторы* – вещества, которые стимулируют рост семян и растений; *дефолианты* – вещества, которые вызывают опадание листьев; *десиканты* – средства для удаления лишних цветов и завязей; *ретарданты* – вещества, которые увеличивают прочность стебля.

Хемостерилизаторы – вещества, которые уменьшают или уничтожают способность вредных организмов к размножению.

Чрезмерное использование пестицидов приводит к нарушению биологического равновесия в экосистеме. Однако полный запрет применения всех пестицидов может привести к потере до 40% урожая. В связи этим будущее принадлежит специфическим методам борьбы с вредителями, в частности, методам биологического воздействия.

3.2. Биологические способы защиты растений

В качестве дополнения или альтернативы пестицидам возможно использование естественных врагов вредителей (паразитов и хищников, в том числе микроорганизмов).

Установлено, что многие виды насекомых-вредителей погибают под влиянием соответствующих энтомопатогенных препаратов.

Впервые энтомопатогенные микроорганизмы (мускаридинный гриб) попытался применить И.И. Мечников против хлебного жука – он собирал и разбрасывал больных личинок.

В настоящее время производится более 30 микробиологических энтомопатогенных препаратов. Они специфически поражают определенные виды насекомых, практически безвредны для человека, теплокровных животных, птиц и полезных насекомых, не вызывают нежелательных изменений в биоценозах и не нарушают экологию.

Отечественная промышленность выпускает три группы энтомопатогенных препаратов.

1. Бактериальные препараты на основе *Bacillus thuringiensis* (энтобактерин, алестин, экзотоксин, дендробациллин и др.).

Они наиболее эффективны против листогрызущих вредителей.

Например, энтобактерин предназначен для борьбы с садово-огородными вредителями, эффективен против 60 видов насекомых. При его производстве используют штаммы, которые образуют δ -токсин. Он представляет собой белковый восьмигранник. При попадании в кишечник насекомых токсин растворяется в щелочной среде и час-

точно гидролизуются протеазами. Такой модифицированный белок взаимодействует со стенкой кишки, в результате чего содержимое кишечного тракта попадает в кровоток насекомых. Это вызывает паралич насекомых. δ -токсин безвреден для млекопитающих животных, человека, птиц. Применяют путем опрыскивания растений водной эмульсией в период активного роста вредителя. Основная масса вредителей погибает в течение 2-10 дней.

2. Грибные препараты. К ним относят: боверин на основе гриба *Beauveria bassiana*, вертициллин на основе гриба *Verticillium lecanii*.

Грибы обладают рядом особенностей: поражение происходит не через пищеварительный тракт, а через кутикулу; насекомые поражаются в фазе развития куколки; грибы обладают большой скоростью роста и репродуктивной способностью; в виде спор в природных условиях длительно не снижают энтомопатогенную активность; обладают высокой специфичностью в поражении отдельных видов насекомых.

Спора гриба проникает в полость тела насекомого, где прорастает в гифу, затем она разрастается в мицелий, от которого отчленяются конидии. Они циркулируют в гемолимфе, выделяя токсины. Если токсина мало или он отсутствует, то мицелий заполняет все тело насекомого, в первую очередь, мышечную ткань.

Например, боверин применяют против листогрызущих вредителей сада, яблоневой и восточной плодожорки, вредителей, личинок колорадского жука на картофеле. С добавлением химических инсектицидов применение препарата приводит к 100% гибели личинок всех возрастов.

3. Препараты на основе вирусов ядерного полиэдроза. К ним относят: вирин-ЭНШ (вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда), вирин-ЭКС (вирус ядерного полиэдроза капустной совки), вирин-КШ (вирус ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда).

Такие препараты обладают высокой специфичностью по отношению к насекомому-хозяину, поэтому они практически безвредны для человека, флоры и фауны. Вирусы устойчивы к неблагоприятным воздействиям окружающей среды (температуре, влажности). Вне насекомого они могут сохранять активность в течение 10-15 лет.

Заражение вирусом происходит при питании насекомого. В кишечнике при щелочных значениях pH освобождаются вирионы. Они проникают через стенку кишечника, а в ядрах восприимчивых клеток осуществляется их репликация. Это приводит к гибели личинок насекомого.

Комбинации нескольких биологических средств оказываются, как правило, более эффективными, чем отдельно взятые препараты.

Для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов применяют следующие средства:

Антибиотики. Например, грибы *Trichoderma sp.* и *Trichotecium roseum* продуцируют триходермин и трихотецин, которые используют для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур.

Фитоалексины. Они синтезируются в тканях растений в ответ на внедрение фитопатогенов и являются высокоспецифичными заменителями пестицидов. Например, фитоалексин перца применяют при фитофторозе.

Микробы-антагонисты. Они вытесняют патогенный вид и подавляют его развитие.

Вакцинные и иммунологические препараты. Их вводят в прорастающие семена.

3.3. Фиторегуляторы в системе защиты растений

Возможность использования фиторегуляторов в борьбе с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений была показана на рубеже 40-50-х годов XX века.

При их применении повышение устойчивости растений к вредоносным организмам обусловлено следующими причинами: препарат является токсином для какого-либо паразита; улучшаются морфологические показатели и общее состояние растения, это делает его менее уязвимым для атаки вредителями и болезнями; изменение метаболизма растения-хозяина неблагоприятно для паразита; изменение фазы развития растения-хозяина относительно фазы паразита ведет к сокращению периода питания, а, следовательно, и снижению вредоносного действия.

Вредители и возбудители заболеваний оказывают регуляторное действие на растение-хозяина, создавая тем самым для себя благоприятные условия.

Многие паразитические организмы синтезируют аналоги цитокининов, обогащают ими зараженные клетки и тем самым обеспечивают приток к месту своего развития питательных веществ из других частей растения. Эти участки остаются «зелеными островками» на пожелтевших листьях. Такие же «зеленые островки» на листьях образуют личинки насекомых, паразитическое растение повилика.

Показано, что насекомые нуждаются для своего развития в некоторых гормонах растений, которые в организме насекомого превращаются в их собственные регуляторные вещества. Так, фитогормон брассинолид ускоряет время наступления линьки насекомых.

В связи с этим предложено использовать гормоны растений или близких по строению веществ как нового поколения инсектицидов. При использовании этих препаратов снижение численности насекомых наступает не за счет блокирования какого-либо звена метаболизма, а за счет изменения времени наступления метаморфоза или влияния на половое созревание.

В ходе эволюции растения выработали собственную систему защиты. Так, под действием повреждений, вызываемых вредителем или патогеном, усиливается биосинтез этилена. Он распространяется во всем растении и разносится ветром. При этом в растении: 1) стимулируется образование фитоалексинов. Это вещества, выполняющие роль антибиотиков у растений; 2) повышается активность хитиназы. Это фермент, разрушающий пищеварительный тракт насекомых или хитиноподобное вещество, из которого состоят стенки гифов патогенных грибов, после чего их протопласты лизируются ферментами растительной клетки; 3) стимулируется синтез другого фитогормона – абсцизовой кислоты. Она затормаживает процессы роста и деления клеток и стимулирует синтез стрессовых белков.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какова роль биотехнологии в сохранении генофонда растений?
- 2) Что такое пестициды?
- 3) Каким требованиям должны удовлетворять пестициды?
- 4) На какие группы делят пестициды?
- 5) Что такое инсектициды? Каков механизм их действия?
- 6) Что такое гербициды? Каков механизм их действия?
- 7) Что такое фунгициды, репелленты, аттрактанты, хемотрепелленты?

- 8) Какие химические вещества относят к регуляторам роста растений?
- 9) Какие биологические способы защиты растений Вам известны?
- 10) Охарактеризуйте группу бактериальных энтомопатогенных препараты на основе *Bacillus thuringiensis* (энтобактерин, алестин, экзотоксин, дендробациллин и др.).
- 11) Охарактеризуйте грибные энтомопатогенные препараты (боверин и вертициллин).
- 12) Охарактеризуйте препараты на основе вирусов ядерного полиэдроза.
- 13) Какие еще биологические способы защиты растений Вы знаете?
- 14) Роль фиторегуляторов в системе защиты растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
3. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
4. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
5. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

Дополнительная

1. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493-1236-2
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. **Блинов, В.А.** ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.
5. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
6. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
7. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 4

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

4.1. Вегетативное размножение растений методом культур тканей

Фитобиотехнология – составная часть биотехнологии (от греческих слов *phyton* – растение, *bios* – жизнь, *teken* – искусство и *logos* – наука, слово). Это наука об использовании растительных объектов в технике и промышленном производстве.

Объекты фитобиотехнологии – клетки и ткани растений, а также биологически активные молекулы растительного происхождения (ферменты, нуклеиновые кислоты, стероиды и др.).

К **фитобиотехнологическим процессам** относят процессы, которые базируются на клеточном уровне, в том числе, когда клетки уже использовались в генно-инженерном эксперименте.

С помощью методов фитобиотехнологии можно выращивать на питательных средах *in vitro* клетки и ткани высших растений, продуцирующих БАВ, в несвойственных им климатических зонах.

Растительные клетки и ткани способны культивироваться в форме неорганизованной клеточной массы – каллуса. Каллусную ткань можно "заставить" формировать зародышеподобные структуры, почки, побеги, а на их основе – растения-регенеранты. Все это происходит благодаря тотипотентности растительных клеток (от лат. *totus* – все, целый, *potentia* – сила, потенция). Т.е. клетка обладает способностью воспроизводить целый организм.

Если в качестве биообъекта применяют изолированный зародыш, меристему верхушечных или пазушных почек, то все получаемые растения-регенеранты полностью соответствуют исходному растению. При применении изолированных клеток и протопластов искусственно создают новые формы растений, пригодные для селекции.

Самые ранние работы по изолированию культур принадлежат Блоцшиевскому (1876), Брауну и Моррису (1892), Боннэ, Саксу (1893). В этих исследованиях зародыши вычленились из семени и выращивались в искусственных условиях. Удачные методы выращивания изолированных тканей были впервые разработаны в 1949 г. Ф. Уайтом и Р. Готре. Дальнейшее развитие методов получения каллусной ткани получено в 1963 г. в лабораториях Б. Скуга и Р.Г. Бутенко.

Микроразмножение *in vitro* осуществляют из зародыша растения, верхушки основного побега, пазушных побегов, суспензионной культуры клеток, промежуточного каллуса и некоторых других. Для этого соответствующие ткани отбирают, стерилизуют и переносят на подходящую питательную среду.

Установлено, что меристемные ткани, сердцевина луковиц, клубнелуковиц и корневищ, которые надежно защищены листьями и чешуйками и являются стерильными. Перед удалением покрывающих структур их каждый раз протирают 70% этанолом. Если источниками тканей являются открытые органы, то их стерилизуют до 40 минут ртуть- или хлорсодержащими агентами (гипохлориты натрия и кальция, сулема) или перексидом водорода.

После стерилизации растительный биообъект трижды промывают свежей стерильной дистиллированной водой.

Компоненты питательных сред делят на 3 группы: 1) источники органического углерода (чаще – сахароза); 2) неорганические соли (включая источники азота); 3) стиму-

ляторы роста (некоторые витамины группы В и растительные гормоны – цитокинины (усиливают или поддерживают рост каллусов и/или корнеобразование *in vitro*) и ауксины (стимулируют образование почек).

Питательные среды могут быть плотными и жидкими. Например, для микрокультуры ананасов предпочтительнее жидкие среды.

В целях предотвращения возможного бактериального и грибного загрязнения в питательные среды добавляют антибиотики (нистатин, цефалоспорин, левомецетин, гентамицин сульфат, канамицин моносульфат, рифампицин и др.).

С помощью метода культур тканей повысили коэффициент размножения садовых древесных растений (яблони) и травянистых декоративных растений (ирис, нарцисс, петуния, фиалка и др.). Доступными для производства стали клетки барбариса – продуцента спазмолитика ятроризина, табака – продуцента убихинона-10. Весьма перспективны каллусные культуры древесных растений.

Перед высадкой проростков в грунт стимулируют корнеобразование с помощью индолилмасляной кислоты.

4.2. Поверхностное культивирование клеток растений

Осуществляют на полужидкой агаризованной среде, среде с добавлением других железирующих полимеров, на дисках из полиуретана, на мостиках из фильтровальной бумаги, полупогруженных в жидкую питательную среду. Можно также использовать комочки ваты, пропитанные питательной средой, которые сверху покрываются кусочком фильтровальной бумаги.

Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную среду через 28 - 30 дней, то есть проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани.

При пассировании ткани на среду, содержащую индукторы органогенеза, клетки приступают к делению. Это приводит либо к формированию почек и побегов (геммогенез), либо к ризогенезу.

4.3. Культивирование клеток растений в глубинных условиях

Для глубинного культивирования растительных клеток применимы способы, разработанные в микробиологии.

Различают два вида систем культивирования:

1) **Закрытая система культивирования** – наиболее изучена и распространена. Для нее характерен периодический режим выращивания. При этом клеточная масса помещается в определенный объем среды. Система закрыта по всем параметрам, кроме газов, до конца выращивания. Периодически подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания.

2) **Открытая (проточная) система культивирования** – поступает свежая питательная среда, при этом отбирается старая питательная среда и часть урожая.

Первый крупномасштабный процесс по выращиванию культур клеток растений (воробейника) был осуществлен в начале 80-х годов для получения вторичного метаболита – шиконина. Это натуральный ярко-красный краситель, обладающий антисептическими свойствами. За один периодический процесс получается около 5 кг конечного

продукта, который накапливается в клетках. На первой стадии клетки воробейника выращивают 9 суток в биореакторе объемом 200 литров на среде с подачей стерильного воздуха. Затем культуру переносят в биореактор меньшего размера со средой, которая стимулирует продукцию шиконина. В третьем реакторе на 750 л ферментацию ведут 2 недели. Клетки на первой стадии белые, на последней – красные. Стоимость красителя в 1983 г. составляла 4000 долларов за килограмм.

Суспензионные культуры используют для промышленного получения вторичных метаболитов, которые используются в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и других отраслях промышленности. Это – алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены, пептиды (ингибиторы фитовирусов). В настоящее время в разных странах в биосинтетической промышленности для получения экономически важных веществ используется около ста видов растений (женьшень, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, мак снотворный и др.).

4.4. Иммобилизация растительных клеток

Иммобилизация клеток и тканей растений – это новый подход, направленный на увеличение выхода вторичных метаболитов. В 1966 г. Мосбаху впервые удалось зафиксировать клетки лишайника *Umbilicaria pustulata* в полиакриламидном геле.

Методы иммобилизации клеток растений: 1) Иммобилизация клеток или субклеточных органелл в инертном субстрате – при этом клетки обволакиваются цементирующей средой (альгинат, агар, коллаген, полиакриламид). 2) Адсорбция клеток на инертном субстрате – клетки прилипают к заряженным шарикам из альгината, полистирола, полиакриламида. 3) Адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул (например, лектин). Применяется редко. 4) Ковалентное связывание с другим инертным носителем. Применяется редко.

Иммобилизованные клетки имеют следующие преимущества перед каллусными и суспензионными культурами: 1) Они образуют биомассу гораздо медленнее, чем клетки, растущие в жидких суспензионных культурах. Это способствует синтезу вторичных метаболитов. 2) Клетки растут в тесном физическом контакте друг с другом. Это благоприятно отражается и на химических контактах. 3) Выход вторичных метаболитов можно регулировать путем изменения химического состава окружающей среды. 4) Удобство выделения вторичных метаболитов.

Существует 2 типа систем культивирования иммобилизованных клеток: 1) Система культуры с плоской основой – клетки выращиваются в горизонтально расположенном сосуде. 2) Система колоночной культуры – клетки выращиваются в вертикальном сосуде.

В обеих системах жидкая среда циркулирует вокруг физически неподвижных клеток.

4.5. Сохранение культур клеток растений

Криосохранение – это замораживание при сверхнизких температурах. Обычно – в жидком азоте, при температуре -196°C . Клетки для замораживания отбирают в середине экспоненциальной фазы ростовой кривой.

Предварительно проводят культивирование в особых условиях. В среду добавляют различные вещества, например: маннит или сорбит – для уменьшения размера вакуо-

лей; аминокислота пролин – для связывания воды в клетке; диметилсульфоксид (ДМСО) – для увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны.

Кроме того, применяют искусственное закаливание к холоду. При этом клеточные культуры выдерживают несколько суток при температуре $+8 - +10^{\circ}\text{C}$, а затем до 6 недель при $+2 - +5^{\circ}\text{C}$.

За час до замораживания в культуру вносят криопротекторы (сахароза, декстран, этиленгликоль, поливинилпирролидон, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин). Они снижают повреждающее действие физико-химических факторов путем изменения проницаемости мембраны, а также точки замерзания и оттаивания.

Охлаждение проводят в два этапа: 1) От $+20$ до -35°C со скоростью $0,5$ градусов в минуту, выдерживают при этой температуре 15 минут. 2) Погружение в жидкий азот (мгновенное охлаждение до -196°C).

Замораживание производят в ампулах объемом 1 мл.

Размораживают ампулы на водяной бане с температурой $+37 - +40^{\circ}\text{C}$ в течение $0,5 - 1$ минуты.

После размораживания клетки отмывают $3 - 10\%$ раствором сахарозы.

Далее клетки проверяют на жизнеспособность сначала с помощью красителей, а затем по четкому возобновлению роста на стандартных питательных средах для данной культуры.

Замедление роста. Замедления роста можно добиться следующими методами: изменение газового состава и атмосферного давления внутри культурального сосуда; изменение светового режима; охлаждение до температуры прекращения активного роста; применение гормональных ингибиторов (хлорхолинхлорид); применение осмотических ингибиторов (манит) и др.

Например, для картофеля рекомендуется клубнеобразование в пробирках.

4.6. Использование методов генетической инженерии в фитобиотехнологии

В генноинженерном эксперименте изолируют конкретный ген, включают его в наследственный аппарат растительной клетки и регенерируют растение с измененным наследственным признаком, которое способно приносить жизнеспособное потомство.

Объединение геномов клеток разных особей осуществляют:

1) половая гибридизация – известна давно, реализуется в природных и искусственных условиях, используется для выведения новых сортов растений и для повышения их продуктивности.

2) соматическая гибридизация – реализуется только в искусственных условиях. При этом соматические клетки предварительно лишают клеточной стенки и трансформируют в протопласты. Протопласты способны сохраняться и метаболизировать, а также реконструировать клеточную стенку в подходящих условиях. Они были впервые получены Дж. Клеркером в 1892 г. из листьев водного растения – телореза.

Протопласты получают следующими методами:

1) механические методы – $0,1\%$ раствором сахарозы добиваются плазмолиза растительных тканей, затем разрезают эпидермис и освобождают протопласты в окружающую питательную среду;

2) биохимические (энзиматические) методы – при этом используют целлюлазы, пектиназы, гемицеллюлазы.

Протопласты используют для регенерации растения или для образования гетерокариотических гибридов. Относительно легко регенерируют из протопластов картофель, люцерна, маниок, рапс, табак.

Первые трансгенные растения были получены в 1983 г. Это – растения табака со встроенными генами из микроорганизмов, устойчивые к вирусной инфекции. Первые успешные полевые испытания этих трансгенных растений были проведены в США в 1986 г. Первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г. (томаты с замедленным созревaniem, гербицидустойчивая соя), а через 2 года еще и кукуруза, картофель, табак, рапс, кабачки, редис, хлопчатник. В настоящее время в США генетически модифицированные растения составляют около 50% посевов кукурузы и сои и более 40% посевов хлопчатника.

Первоначально трансгенные растения содержали дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам). В настоящее время развивается "метаболическая инженерия". При этом ставится задача: научить растение производить новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что понимают под термином «фитобиотехнология»?
- 2) Что является объектами фитобиотехнологии?
- 3) Какие процессы относят к фитобиотехнологическим?
- 4) Что такое каллус?
- 5) Что понимают под тотипотентностью растительных клеток?
- 6) Что такое растения-регенеранты?
- 7) Охарактеризуйте способ вегетативного размножения растений методом культур тканей.
- 8) Охарактеризуйте способ поверхностного культивирования клеток растений.
- 9) Охарактеризуйте закрытую систему культивирования растительных клеток в глубинных условиях.
- 10) Охарактеризуйте открытую (проточную) систему культивирования растительных клеток в глубинных условиях.
- 11) Когда было впервые осуществлено крупномасштабное выращивание культур клеток растений?
- 12) Для каких целей используют суспензионные культуры клеток растений?
- 13) Какие методы иммобилизации клеток растений известны?
- 14) Какие преимущества имеют иммобилизованные клетки перед каллусными и суспензионными культурами?
- 15) Какие типы систем культивирования иммобилизованных клеток известны?
- 16) В чем заключается принцип криосохранения?
- 17) Какие операции проводят перед криосохранением культур клеток растений?
- 18) Каким образом проводят закаливание культур клеток растений на холоду?
- 19) С какой целью в культуру клеток растений вносят криопротекторы?
- 20) Какие вещества используют в качестве криопротекторов?
- 21) Как проводят охлаждение культур клеток растений при криосохранении?
- 22) Как проводят размораживание ампул с культурами клеток растений после криосохранения?
- 23) Как проверяют клетки растений на жизнеспособность после длительного хранения?
- 24) В чем заключается принцип генно-инженерного эксперимента при создании растений с новыми признаками?
- 25) Каким образом осуществляют объединение геномов клеток разных особей?
- 26) Что такое протопласты и какими методами их получают?

27) Какие трансгенные растения уже созданы?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. Генетически модифицированные растения и продукты питания: реальность и безопасность. Аналитический обзор [Электронный ресурс]. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 200 с. – ISBN: 5-7367-0543-5 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М: Мир, 2002. – 589 с.
4. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
5. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
7. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

Дополнительная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
3. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
4. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 5

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ЗАГОТОВКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОРМОВ

5.1. Принцип силосования кормов

Силосование (от испанского *silos* – яма) – это биологический метод консервирования кормов, в основе которого лежит молочнокислое брожение.

Технология силосования: 1) скашивание (с проявлением или без него) и измельчение растений; 2) транспортировка зеленой массы к месту силосования; 3) укладка в хранилища (траншеи, ямы), разравнивание и уплотнение силосуемой массы; 4) плотное укрытие и изоляция силосуемого сырья от воздуха после заполнения хранилища. Различают силос из кукурузы, силос из однолетних и многолетних растений, комбинированный силос.

Преимущества силосования: 1) сочную растительную массу можно силосовать в любую погоду, при этом потери составных частей корма, в том числе и витаминов, значительно ниже, чем, например, при заготовке сена; 2) правильно заквашенный корм хорошо поедается животными, в результате чего повышается их продуктивность; 3) силосовать можно такие корма (ботва свеклы, картофеля, отходы крахмалопаточного производства), которые часто не используются в хозяйствах; 4) засилосованный корм можно хранить длительное время, иногда десятилетиями; 5) правильно приготовленный силос имеет хорошие вкусовые качества, возбуждает аппетит и в сбалансированных рационах улучшает использование разных составных частей корма.

Способы силосования кормов: 1) *Холодный способ* – проходит при температуре (25 - 35 °С). При этом измельченная силосуемая масса плотно укладывается и хорошо изолируется от воздуха. Холодный способ силосования в нашей стране распространен повсеместно. 2) *Горячий способ* – проходит при температуре 50 °С. При этом корм укладывают рыхло и постепенно, что создает условия для более бурного развития микробиологических процессов. При такой технологии происходит потеря больших количеств питательных веществ.

Главное консервирующее средство – молочная кислота. Микроорганизмы способны превращать сахара в молочную, уксусную, пропионовую и другие кислоты, которые придают корму острый специфический запах. Кроме сахаров в растениях содержатся протеины, аминокислоты, минеральные соли, которые нейтрализуют, связывают образовавшиеся кислоты и выполняют роль буферных веществ.

Силосуемость растений определяется **сахарным минимумом** – это процент сахара в растениях, необходимый для накопления молочной кислоты в количестве, обеспечивающем смещение рН силоса до 4,2 при данной буферности исходного сырья.

При содержании в растениях большого количества сахаров и недостатке протеина силос получается перекисленным и животные его плохо поедают. Избыточное содержание влаги в силосуемой массе ведет к накоплению большого количества жидкости, и жизнь клеток скошенных растений продлевается, на что используются сахара, крахмал, протеин. Чтобы предотвратить ферментативные процессы, силосуемую массу быстро закладывают в кормохранилища и изолируют от воздуха.

При несоблюдении правил силосования наряду начинают развиваться микробиологические процессы. Это ведет к повышению температуры, протеины вступают во взаимодействие с сахарами; образуются пахучие вещества – изовалеоаниловый альдегид

(напоминает запах ржаного хлеба), фурфурол (запах яблок), оксиметилфурфурол (запах меда). Такой корм охотно поедается животными, так как ароматические вещества возбуждают у них аппетит. Однако он беден протеином, каротином и другими питательными веществами, необходимыми для нормальной жизнедеятельности организма животных.

5.2. Микрофлора силоса

Молочнокислые бактерии. Возбудителей молочнокислого брожения делят на две группы: 1) *гомоферментативные* – образуют из сахаров в основном молочную кислоту; 2) *гетероферментативные* – кроме молочной образуют уксусную кислоту, диоксид углерода, иногда этиловый спирт.

Бактерии группы кишечной палочки – участвуют в гетероферментативном молочнокислом брожении и образуют большое количество газов (*E. coli*). В кормовой массе они встречаются в начале силосования; с накоплением молочной кислоты их численность уменьшается. В результате их жизнедеятельности происходит превращение сахаров в малоценные продукты, что снижает питательность корма.

Аммонификаторы (гнилостные микробы) – всегда имеются на поверхности растений (сенная, картофельная, капустная и другие бациллы, а также эшерихии и протей). Они вызывают энергичное разложение белков в начале процесса силосования, когда pH более 4,5 - 4,7. При медленном подкислении корма аммонификаторы продолжают усиленно размножаться, накапливаются продукты распада протеина, которые могут вызывать отравление животных.

Дрожжи – всегда могут быть в растительной массе. Они сбраживают сахара до спирта, придают корму приятный запах и вкус, что возбуждает у животных аппетит, продуцируют витамины и другие биологически активные вещества, что способствует развитию микроорганизмов. Однако дрожжи для своей жизнедеятельности используют сахара, а, следовательно, уменьшают образование молочной кислоты. Некоторые из дрожжей даже разлагают органические кислоты, что тормозит процесс силосования. Обычно дрожжи усиленно размножаются в начале процесса, а затем их численность уменьшается.

Плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.). В силосной массе сохраняются недолго. Они хорошо переносят кислую среду, но являются аэробами. При доступе воздуха плесневые грибы энергично размножаются и используют молочную и другие органические кислоты. Это ведет к повышению pH, созданию условий для развития споровых форм микробов – маслянокислых и аммонификаторов, в результате чего корм становится непригодным к скармливанию животным.

Маслянокислые бациллы (*кlostридии*) – попадают на растения из почвы. Это – облигатные анаэробы, поэтому при хорошем уплотнении силосуемой массы создаются условия для их развития. Они сбраживают сахара с образованием масляной кислоты, диоксида углерода и водорода. Кроме того могут образовываться уксусная, пропионовая и муравьиная кислоты, а также спирты (этиловый, бутиловый и ацетон). Маслянокислые бациллы способны переводить молочную кислоту в масляную. Она придает горький вкус и неприятный запах корму, поэтому он плохо поедается животными. При попадании маслянокислых бацилл из корма в молоко и молочные продукты (сыры) ухудшается их качество, развиваются процессы, приводящие к порче продуктов. Маслянокислые бациллы имеют мощный ферментативный аппарат, способны усваивать молекулярный азот из воздуха. При pH 4,7 и ниже маслянокислые бациллы развиваться

не могут.

Уксуснокислые и целлюлозоразлагающие микробы – являются аэробами, и в хорошо засилосованном корме нет условий для их развития. Уксусная кислота может образовываться некоторыми молочнокислыми бактериями, поэтому она всегда присутствует в силосе. Целлюлозоразлагающие микробы не выдерживают кислой среды, не размножаются в силосе и практически не вызывают изменения клетки.

Силосование – динамический процесс, в котором выделяют три фазы:

Первая фаза – развитие смешанной микрофлоры. После скашивания растений изменяется их физиологическое состояние. Нарушается целостность клеток, в окружающую среду выделяется сок, а вместе с ним и легкорастворимые сахара. Пространство между растениями заполняется соком, но в некоторых местах остается воздух, создаются условия для развития разных физиологических групп. С уплотнением силосной массы условия меняются, прекращается доступ кислорода воздуха, интенсивнее развиваются молочнокислые бактерии, накапливаются кислоты, тормозится развитие других физиологических групп микроорганизмов. Эта фаза сравнительно быстро проходит при холодном способе силосования и длится дольше при горячем способе.

Вторая фаза – основное брожение. При этом преобладают молочнокислые бактерии. Они продолжают подкислять корм. Происходит гибель и задержка роста неспорообразующих микробов, сохраняются бациллы. Молочнокислые кокки постепенно заменяются молочнокислыми палочками. К этому времени питательные вещества корма в значительной степени расходуются, наступают неблагоприятные условия для развития микроорганизмов, поэтому их количество постепенно уменьшается.

Третья фаза – окончание микробиологических процессов в силосуемой массе. При этом накапливается большое количество молочной кислоты, постепенно отмирают кокковые и палочковидные формы микробов.

Химические процессы, которые происходят при силосовании зеленой массы растений, разделяют на 5 фаз: **1)** Растительные клетки продолжают дышать; при этом они выделяют углекислый газ и расходуют углеводы; **2)** Образование уксусной кислоты; **3)** образование молочной кислоты. Первые три фазы продолжаются по 3 - 5 дней. **4)** Накопление молочной кислоты; рН снижается до 4,2 - 3,8; длится 12 - 21 день; **5)** начинает образовываться масляная кислота, если содержание молочной недостаточно высоко. При этом разрушаются молочная кислота, протеины, углеводы. Это вызывает порчу силоса.

При силосовании кормов определенную роль играют антимикробные выделения растений – *фитонциды*, которые убивают на живых листьях и стеблях микроорганизмы или не дают им воспользоваться питательными веществами. После отмирания растений эти защитные свойства утрачиваются. Поскольку скошенные растения отмирают не сразу, то они некоторое время сохраняют свою фитонцидность. Действие этих веществ на гнилостные и маслянокислые микроорганизмы более сильное, чем на молочнокислые бактерии. Поэтому в изолированной растительной массе размножение гнилостной и маслянокислой микрофлоры задерживается веществами, выделяемыми травами. Молочнокислые бактерии в это время будут развиваться и перерабатывать сахара в молочную кислоту, которая подкисляет силосную массу. Достаточно кислая среда подавляет жизнедеятельность гнилостной и маслянокислой микрофлоры.

5.3. Химическое силосование сочных кормов

Химическое силосование позволяет сократить потери питательных веществ почти в 2 раза и повысить переваримость кормовых культур. Консервирующий эффект химического препарата обуславливается ингибированием ферментов в скошенных растениях. Химическими консервантами можно регулировать жизнедеятельность микроорганизмов. Так, при силосовании кукурузы, сорго, подсолнечника важно не только подавить гнилостные и маслянокислые бактерии, но и ограничить развитие молочнокислых и дрожжевых клеток, так как они вызывают большие потери сахаров. Особенность химического консервирования – значительное уменьшение степени гидролиза белков, углеводов. При этом удастся снизить потери питательных веществ в 2 - 3 раза, а в отдельных случаях – в 4 - 6 раз; на 15 - 20 % увеличить выход силоса.

В настоящее время для консервирования зеленых кормов и влажного зерна испытано около 2 тыс. химических соединений. При выборе консерванта учитывают отсутствие у него ядовитых и канцерогенных свойств; стоимость; удобство и безопасность при внесении в силосную массу.

Выпускаются следующие **консерванты**: **1)** концентрированная смесь низкомолекулярных жирных кислот – содержит не более 35 % воды, 30 % уксусной кислоты, 27 - 29 % муравьиной, не менее 5 % пропионовой и не более 5 % масляной кислот; **2)** уксусная кислота; **3)** бензойная кислота – консервирующее действие проявляется при pH корма 4,5. Она подавляет развитие дрожжей, кишечной палочки и в меньшей степени – маслянокислых и уксуснокислых бактерий; **4)** пиросульфат натрия; **5)** бисульфат натрия – действует на гнилостные бактерии и очень слабо – на молочнокислые; при этом в силосе ухудшается соотношение органических кислот.

5.4. Ферментные препараты и бактериальные закваски для силосования кормов

Современным биотехнологическим приемом стабилизации и биоконверсии кормов является применение ферментных препаратов микробного или грибного происхождения.

В настоящее время используется множество ферментов, например, пектафозетидин П10х, амилосубтилин ГЗх. Очищенные ферментные препараты вносятся в дозе 0,02 - 0,05 % от массы сырья, а неочищенные – 0,5 - 1 %. «Х» означает ферментные препараты без предварительной очистки. «Цифры» характеризуют степень активности по отношению к нативной культуре. «П» – поверхностное выращивание культуры, а «Г» – глубинное.

Процессом силосования можно управлять путем искусственного обогащения зеленой массы специальными культурами молочнокислых бактерий (*Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. faecalis*, *Streptococcus lactis*, *L. brevis*). Они активно размножаются в ней и ведут процесс созревания силоса в нужном направлении. С этой целью выращивают биомассу, которую затем переводят в анабиотическое состояние.

Кроме монокультур при изготовлении заквасок для силосования применяют смеси культур. В состав заквасок следует вводить бактерии с амилалитической и целлюлазной активностью. Часто ферменты и закваски применяют совместно.

5.5. Теоретические основы сенажирования трав

Сенажирование – разновидность консервирования корма, который получается из

проявленных до влажности 40 - 55 % многолетних и однолетних трав. Сохранность кормов обеспечивается не за счет значительной кислотности, а за счет физиологической сухости исходного сырья, сохраняемого в анаэробных условиях. pH сенажа – 4,4 - 5,6. По аминокислотному составу сенаж приближается к зеленым растениям.

При сенажировании могут образовываться оксиды азота, диоксид серы и сероводород. Они подавляют жизнедеятельность гнилостных и других бактерий и тем самым способствуют повышению качества силоса, сохранности питательных веществ.

Технология приготовления сенажа: 1) скашивание и проявление растений; 2) подбор травы из валков, измельчение ее и погрузка в транспортные средства; 3) транспортировка и закладка в хранилище (траншеи); 4) укрытие хранилищ.

Для приготовления сенажа используют бобовые культуры – люцерну, клевер, донник, эспарцет, козлятник восточный; злаковые – кострец, тимофеевку; смеси бобовых и злаковых культур. Различают сенаж из однолетних трав; из смеси бобовых и злаковых трав; из многолетних трав.

Микробиологические и биохимические процессы при сенажировании

Исходная влажность растительной массы, закладываемой на консервирование, влияет на соотношение в ней разных групп бактерий и на интенсивность микробиологических процессов. Например, в подвяленном клевере численность микроорганизмов в 80 - 100 раз выше, чем в исходном сырье с влажностью 74 %. Молочнокислые бактерии составляют 80 - 90 % от общего количества микроорганизмов.

Молочнокислые бактерии имеют повышенное осмотическое давление в клетках. Это позволяет им активно проявлять свою жизнедеятельность тогда, когда развитие гнилостных микроорганизмов подавлено. Они имеют увеличенный объем клеток и сбраживают маннозу, рамнозу, сорбит, декстрин и крахмал, а основными продуктами брожения являются молочная и уксусная кислоты. Микробиологические процессы интенсивно протекают в первые 7 - 15 дней.

В проявленном сырье жизнедеятельность кишечной палочки и гнилостной микрофлоры ограничена при 65%-й влажности, а размножение молочнокислых бактерий сводится к минимуму при снижении влажности до 40 %.

Скорость течения микробиологических процессов связана с образованием органических кислот. Их наибольшее количество наблюдается, когда численность микроорганизмов достигает максимума, причем в сенаже молочной кислоты в 2,4 раза меньше, чем в силосе, а свободной уксусной – в 2 раза.

В клетках проявленных растений в связи с активизацией амилазы, происходит гидролиз крахмала и накапливаются легкосбраживаемые углеводы. Концентрация их в клеточном соке увеличивается в 2 раза, что создает благоприятные условия для развития молочнокислых бактерий при консервировании высокобелковых трудносилосующихся культур.

В процессе сенажирования под действием протеаз растительных клеток происходит ферментативный гидролиз белка. Распад белка идет до аминокислот через промежуточные соединения и аммиака.

Через некоторое время после закладки растительной массы в газонепроницаемое сооружение наступает анаэробноз, и распад белка ограничивается стадией образования аминокислот. По мере накопления аминокислот активность протеаз снижается, а затем прекращается.

Повышенное осмотическое давление угнетает рост сначала маслянокислых микро-

бов, затем молочнокислых и наконец гнилостных. При этом понижается рН, который в совокупности с осмотическим давлением препятствует затем развитию маслянокислых бактерий. Поэтому в сенаже масляная кислота обычно отсутствует, и появляется только в результате гнилостного распада протеина.

В сенажной массе образуется молочной кислоты – около 80 %, а уксусной – около 20 % от общего количества образующихся органических кислот. Они служат консервантами.

В образовании уксусной кислоты участвуют дрожжи, уксуснокислые, молочнокислые, маслянокислые бактерии и другие микроорганизмы. В первые сутки брожения в корме преобладает уксусная кислота, в дальнейшем образование ее затухает.

При сильном уплотнении массы температура в ней колеблется в пределах 27 - 37 °С. При слабом уплотнении температура повышается до 40 - 45 °С и более, развивается маслянокислое брожение.

5.6. Протеинизация крахмалсодержащего сырья

Для увеличения количества протеина в растительных кормах используют два приема: 1) Выращивание микроорганизмов на крахмалсодержащем сырье. Это повышает количество протеина и обогащает продукт витаминами. Например, в дрожжах присутствуют все витамины группы В и различные другие вещества, стимулирующие рост и метаболизм; 2) *Введение гидролитических ферментов.* Добавление таких ферментов в корма увеличивает прирост живой массы животных и птиц в среднем на 10 - 15 % и снижает затраты корма на 1 кг прироста на 5 - 7 %.

Технологический процесс получения белково-ферментного препарата

1. *Приготовление посевного материала.* Дрожжеподобную культуру *Enolomycopsis fibulgera R-574* выращивают на питательной среде, которая содержит (в %): мелассу – 5,0 или различную фуражную муку – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,3; CaCl_2 – 0,04. Исходное значение рН среды – 6,8 - 7,2; температура выращивания 30 - 32 °С. В ферментаторе инокулят размножается на мелассной среде. В культуральную жидкость его вводят из расчета 1 %. Выращивание посевного материала длится 13 - 16 ч.

2. *Главная ферментация.* Дрожжевую культуру в главном ферментаторе выращивают при температуре 30 - 32 °С с постоянным перемешиванием и подачей воздуха 12 ч. Следует помнить, что живые клетки в организме животных перевариваются с трудом, поэтому часть дрожжевого белка не усваивается. В связи с этим культуральную жидкость подогревают до 90 °С в течение получаса. Готовая продукция не может долго храниться, и поэтому её после завершения ферментации направляют на ферму для скормливания животным в смеси с другими кормами.

5.7. Модификация сока зеленых растений

Из зеленой массы люцерны, клевера и травосмеси можно за сезон получить свыше 1 тонны протеина с гектара. Стоимость протеина зеленой массы в 2,5 - 5 раз меньше, чем протеина зерна.

В настоящее время предложены следующие методы получения протеиновых концентратов: отжатие сока; коагуляция протеина с последующим центрифугированием и сушкой. Эти методы достаточно сложные, дорогие, требуют значительных энергозатрат.

Большую привлекательность имеет технология анаэробной ферментации растительного сока и коагуляция белка химико-биологическим путем, а также силосование жома. В этом процессе спонтанного брожения контролируется общая кислотность и соотношение кислот. При достижении определенного pH происходит коагуляция протеина, иногда для усиления ее добавляют флокулянты или химические консерванты.

При анаэробной ферментации кормовые свойства растительного протеина улучшаются, так как инактивируется ингибитор трипсина, алкалоидов, трансформируется фенол, ненасыщенные жирные кислоты. К растительному протеину присоединяется бактериальная биомасса с высоким содержанием метионина. По химическому составу ферментативный сок приближается к обрату. Причем, срок хранения такого продукта значительно увеличивается. Качество же силосованного жома улучшается путем внесения закваски молочнокислых бактерий.

Технология ферментации растительного сока

Периодическая технология. Ферментатор-коагулятор постепенно заполняют свежесотжатым соком. Когда pH снижается до 4,2 - 4,5, сок уже можно скармливать животным, не отделяя коагулят или выделяя часть протеина с коагулятом.

Непрерывная или полунепрерывная технология. В центральную часть ферментатора-коагулятора непрерывно или порциями подают свежий сок, который вытесняет из аппарата ферментированный сок. Периодически из нижней части выпускают коагулят. При такой технологии и вследствие полного заполнения ферментатора-коагулятора жидкостью, в нем создаются анаэробные условия и не развивается плесень. Аппарат может работать неделями без остановки и чистки. Перед началом ферментации в чистый аппарат необходимо ввести около 10 % активно бродящего сока или суспензию закваски кислотообразующих бактерий.

Этот процесс технически не сложен, малоэнергоемок. Полученный сок практически свободен от целлюлозы и содержит 1 - 3 % протеина.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое силосование?
- 2) Из каких этапов состоит технология силосования кормов?
- 3) Перечислите преимущества силосования.
- 4) Способы силосования кормов.
- 5) Что понимают под термином «сахарный минимум»?
- 6) Какие факторы влияют на качество силоса?
- 7) Перечислите основные группы микроорганизмов, составляющих микрофлору силоса. Каковы их функции?
- 8) Охарактеризуйте фазы силосования в зависимости от развития микрофлоры в силосуемой массе.
- 9) Какие химические процессы протекают в процессе силосования зеленой массы?
- 10) Роль фитонцидов при силосовании.
- 11) Принцип химического консервирования сочных кормов.
- 12) Перечислите химические средства для консервирования зеленых кормов и влажного зерна.
- 13) Какие современные приемы стабилизации и биоконверсии кормов известны?
- 14) Назовите главные факторы, обуславливающие сохранность кормов при силосовании.
- 15) pH силоса.
- 16) Что такое сенажирование?
- 17) Из каких этапов состоит технология приготовления сенажа?

- 18) Какие микробиологические и биохимические процессы происходят при сенажировании?
- 19) Назовите главные факторы, обуславливающие сохранность кормов при сенажировании.
- 20) pH сенажа.
- 21) Какие приемы используют для увеличения количества протеина в растительных кормах?
- 22) Опишите технологию получения белково-ферментного препарата с использованием крахмалсодержащего сырья.
- 23) Обоснуйте целесообразность ферментации растительного сока и силосования жома.
- 24) Опишите технологию ферментации растительного сока.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Блинов, В.А.** Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / В.А. Блинов, С.В. Ковалева, С.Н. Буршина. – Саратов: ИЦ «Наука», 2011. – 171 с. – ISBN 978-5-9999-0927-5
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. **Мотовилов, К.Я.** Экспертиза кормов и кормовых добавок: учебно-справочное пособие / К.Я. Мотовилов, А.П. Булато, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 336 с.
6. **Никульников, В.С.** Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретицин. – М.: Колос, 2007. – 544 с. – ISBN 978-5-10-003966-2
7. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
8. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
9. **Фаритов, Т.А.** Корма и кормовые добавки для животных: учебное пособие / Т.А. Фаритов. – СПб.: Лань, 2010. – 304 с. – ISBN 978-5-8114-1026-2
10. **Фисинин, В.И.** Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник / В.И. Фисинин, И.А. Егоров, И.Ф. Драганов. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 344 с. – ISBN 978-5-9704-1996-0

Дополнительная

1. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493-1236-2
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. **Блинов, В.А.** Биотехнология пивной дробины (консервирование и биотрансформация) / В.А. Блинов, И.А. Сазонова, Е.Н. Зеленцова. – Саратов: «Контур-Про», 2006. – 65 с.
5. **Блинов, В.А.** ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. –

205 с.

6. Журналы: Ветеринария и кормление, Главный зоотехник, Животноводство России, Зоотехния, Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство, Кормопроизводство, Птицеводство, Свиноводство.

7. Адаптивное кормопроизводство: Международный научно-практический электронный журнал ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса; ссылка доступа – http://adaptagro.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=73&lang=ru

8. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)

9. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)

10. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 6

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВОГО БЕЛКА

6.1. Нетрадиционные источники кормового белка

При дефиците белка в рационе в организме животных развиваются глубокие негативные изменения: отрицательный азотистый баланс, гипопроотеинемии, нарушения коллоидно-осмотического и водно-солевого обмена, анемии различной формы, нарушения со стороны нервной, эндокринной и сердечно-сосудистой системы, сдвиги обмена веществ, остановка роста, истощение и т.д. Особенно тяжелые нарушения развиваются в молодом возрасте. Весьма опасно не только полное отсутствие белка в пище, но и недостаточное поступление его в организм или поступление некачественного белка. Белок корма должен содержать все аминокислоты, особенно незаменимые, быть по составу близок аминокислотному составу белков организма и легко перевариваться в желудочно-кишечном тракте.

Недостаток кормового белка в масштабах планеты по данным ФАО ООН оценивается примерно в 30 млн т в год. Коренным образом изменить эту ситуацию возможно лишь биотехнологическим путем. Причем, продуцентами кормового белка могут быть бактерии, дрожжи, микроскопические водоросли, микро- и макробиоты.

Преимущества производства биомассы с помощью микробного синтеза (перед другими источниками белка): **1)** высокая скорость накопления биомассы, которая в 500 - 5000 раз выше, чем у растений или животных; **2)** микробные клетки накапливают большое количество белка (дрожжи – до 60 %, бактерии – до 75 % по массе); **3)** в производстве микробного белка отсутствует многостадийность; **4)** процесс биосинтеза протекает в мягких условиях при температуре 30 - 45°C, pH 3 - 6 и давлении $\approx 0,1$ МПа; **5)** процесс менее трудоемок по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белков.

Дрожжи. Их легко выращивать в производственных условиях; они быстро растут и размножаются практически на любых субстратах; устойчивы к контаминантной микрофлоре; содержат белка больше, чем зерно злаковых культур, несколько уступая лишь по аминокислотному составу протеину молока и рыбной муки; богаты витаминами (тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, пиридоксин, фолиевая кислота, а также холин, инозит и др.); содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты. Так, 1 кг кормовых дрожжей содержит 1,03 - 1,16 кормовых единиц. К недостаткам дрожжей относят толстую клеточную стенку и большое количество нуклеиновых кислот.

Бактерии. Для них характерна высокая скорость роста; содержание белка в биомассе составляет 70 - 80 % при значительном количестве метионина; они легко поддаются селекции, что позволяет получать высокопродуктивные штаммы. Их недостатками являются трудная осаждаемость, вследствие малых размеров клеток; значительная чувствительность к инфекциям, особенно фаговым; высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот.

Водоросли. Микроскопические водоросли как фототрофы для образования своей биомассы используют только углекислый газ атмосферы. Так, с 0,1 га поверхности прудов можно получить столько же белка, сколько с 14 га посевов фасоли. В настоящее время особое внимание привлекает сине-зеленая водоросль спирулина (*Spirulina platensis* и *Spirulina maxima*). Биомасса её соответствует лучшим стандартам пищевого белка,

в ней достаточно витаминов А, D, а также группы В. В качестве кормовых добавок применяют также препарат спирустим, изготавливаемый из одноклеточных сине-зеленых водорослей *Spirulina platensis*, хлореллу. Новой добавкой к рациону является гипергалинная аквакультура (ГАК) Сиваша, которая включает микроводоросли, продукты их переработки, а также цисты, яйца, личинки, куколки и взрослые формы гидробионтов и галофильных насекомых, которые обитают в акватории высокой солености.

Грибы. Важным источником высококачественного белка могут быть как низшие, так и высшие грибы. Высокая питательная ценность плодовых тел высших грибов известна давно. Однако их валовой сбор в природных условиях, естественно, не может удовлетворить все возрастающие потребности в белке. Поэтому были сделаны попытки культивирования в промышленных условиях мицелия макромицетов. Благодаря макромицетам крахмалсодержащая пища обогащается белком и становится подобной мясным продуктам. Однако, по сравнению с эталонным белком, белки грибов лимитированы по сумме аминокислот, содержащих серу (цистеин и метионин). Вместе с тем они богаты лизином – основной аминокислотой, недостающей в белке зерновых культур. Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные кормовые смеси.

6.2. Сырьевая база для синтеза кормового белка

Сырьевые источники для синтеза микробного белка весьма значительны и легко доступны. Для получения микробного белка необходим богатый углеродом, но дешевый субстрат.

Парафины нефти (n-парафины). Высокий выход биомассы (до 100 % от массы субстрата) обеспечивается большим содержанием углерода, а качество продукта – степенью чистоты парафинов. Если парафины очищены недостаточно, то дрожжевая биомасса содержит неметаболизируемые компоненты: производные бензола, D-аминокислоты, липиды с нечетным числом углеродных атомов в жирных кислотах, токсины белковой природы. Поэтому парафины нефти должны быть тщательно очищены. Дрожжи, выращенные на n-парафинах, используются в количестве 8 - 15 % от общего белка рациона для откорма крупного рогатого скота, свиней, овец и бройлеров.

Метанол. Его получают методом микробного синтеза из древесины, соломы, городских отходов. Сложность использования метанола заключается в том, что молекула его содержит только один атом углерода, тогда как синтез большинства органических соединений осуществляется через двухуглеродные молекулы. Соединения же с нечетным числом атомов углерода, как правило, небезразличны для организма. В качестве продуцента используются бактерии рода *Methylomonas*. Метанол усваивают бактерии, дрожжи, грибы, актиномицеты. Получение белка на метаноле более экономично, чем при использовании n-парафинов. Например, продукт «Прутин» (Англия), содержащий 72 % сырого протеина, используется как высокобелковая добавка к комбикормам в рационах свиней, птицы, пушных зверей и в качестве заменителя молока для телят.

Этанол. Использование этанола как субстрата для микробного синтеза белка снимает проблему очистки биомассы от аномальных продуктов обмена с нечетным числом углеродных атомов. Стоимость производства этанола несколько выше, чем метанола. Разработаны технологические процессы получения белка на природном газе с использованием бактерий *Methylomonas*, усваивающих метан, *Hypermicrobium* и *Pseudomonas*, утилизирующих метанол и др.

Растительная биомасса. Содержит большое количество сахаров (целлюлоза, состоящая из остатков молекулы глюкозы; гемицеллюлозы, состоящие из остатков арабинозы, галактозы, маннозы, фруктозы, ксилозы). На жидкой, содержащей сахара фракции гидролизата, выращивают дрожжи. Для получения кормовых дрожжей используется также послеспиртовая барда, подсолнечная лузга, хлопковая шелуха, отходы производства лубяных волокон (костер льна и конопля), свекловичный жом, отходы картофелекрахмального производства, пивоваренной, плодовоовощной, консервной промышленности и др. В качестве сырья для гидролизной промышленности используется солома злаковых культур, которая обычно протеинизируется, например, дрожжеванием, или усвояемость соломы повышается действием ферментных препаратов (пектофетицина ГЗх в комплексе с целловиридином ГЗх или глюкавамоорином Пх). Используются способы прямой биоконверсии растительной биомассы с помощью высших и низших грибов. С этой целью используются целлюлозоразрушающие грибы *Chaetomium cellulolyticum*, а также *Aspergillus niger*, *Trichoderma* и др.

Молочная сыворотка. Ежегодно в мире образуется около 200 млн. т молочной сыворотки. Каждая тонна сыворотки содержит 50 кг молочного сахара, до 10 кг высокоценного белка, 1,5 кг жира, а также витамины, микроэлементы и др. Использование сыворотки малоэффективно как для производства кормов, так и для скармливания животных. Это связано с тем, что степень утилизации молочной сыворотки снижается по мере увеличения её доли в рационе. Кроме того, при этом возникают расстройства пищеварения, а конверсия белка сыворотки в белок тела животного весьма незначительна. Это касается и сухой сыворотки, так как организм животного усваивает только 20% её количества из-за неблагоприятного соотношения углеводов, белков и минеральных солей. В этом отношении более рациональным является производство молочно-белковых концентратов. При этом на основе белков сыворотки изготавливают заменители сухого обезжиренного молока, кормовые добавки и др.

Лактоза может быть источником энергии для многих видов микроорганизмов, сырьем для микробного производства белковой биомассы. Для ее получения чаще всего используют дрожжи. Установлено, что коэффициент конверсии белка сыворотки в микробный белок у дрожжей в 20 раз выше, чем степень преобразования его в животный белок. Кроме того, большинство видов дрожжей обогащает сыворотку витаминами. В качестве продуцентов применяют различные штаммы родов *Saccharomyces*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*.

6.3. Принципиальная технологическая схема выращивания кормовой биомассы

Чистую культуру в *log*-стадии переносят в малый посевной аппарат (500 л) с питательной средой, рН которой доводится аммиачной водой или известковым молоком до 5,5 - 5,8. Сначала в аппарат подают около 40 л среды, разбавляют её в 4 - 4,5 раза стерильной водой и при интенсивной аэрации добавляют остальное количество питательной среды (80 - 100 л), рН среды – 4,5 - 5,5. Из качалочных колб вносят микробную суспензию объемом 1,5 - 2 л и производят культивирование до накопления в среде 3,5 - 4,0 г клеток/л по абсолютно сухому веществ (АСВ). Обычно для этого требуется 15 - 18 ч.

Суспензия из малого посевного аппарата подается в аппарат объемом 4 - 5 м³, предварительно заполненный питательной средой ($\approx$ 200 л) и стерильной водой (1,2 - 1,5 м³), включается аэрация и при постоянном доливе (70 - 75 л/ч) питательной среды и добавления аммиачной воды для поддержания заданного рН проводится куль-

тивирование 10 - 12 ч.

Выращивание засевной культуры проводится в ферментаторе объемом 15 - 20 м³. Аппарат на 10 % по объему заполняется стерильной или кипяченой водой, туда же вводится около 0,5 м³ питательной среды и полностью перекачивается все содержимое предыдущего аппарата (2,5 - 2,7 м³). Выращивание посевного материала без отбора суспензии продолжается 8 - 9 часов при интенсивной аэрации и постоянном доливе питательной среды (170 - 200 л/ч) до накопления в ферментере биомассы в количестве 4 - 5 г АСВ/л. После этого засевную культуру начинают отбирать на основное производство в количестве 1,3 - 1,7 м³/ч при одновременном доливе питательной среды.

Процесс ферментации длится от 5 до 10 суток, а затем цикл приготовления посевного материала возобновляется. К подготовительным стадиям производства относится приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, необходимых для нормального развития микроорганизмов. Этот участок имеет свою технологическую схему. Минеральные компоненты группируют в два раствора, которые параллельно подаются в основной ферментатор: раствор всех микроэлементов (N, P, K), необходимое количество которых составляет 5 - 70 г/л; раствор микроэлементов (Mg, Mn, Fe, Zn и др.), концентрации которых не превышают 5 - 10 мг/л.

Технологические потоки из всех подготовительных отделений (компримирование воздуха, хранение и подготовка сырья, получение засевной культуры, приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, технологическая вода, аммиачная вода, стерильная культуральная жидкость) поступают на главную стадию производства – *стадию ферментации*. Основным аппаратом в этом отделении является ферментатор – аппарат полного смешения по жидкой фазе, обеспечивающий рост и развитие популяций микроорганизмов в объеме жидкой фазы; транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов; отвод от микробных клеток продуктов их обмена; отвод из среды тепла.

Затем следуют другие этапы технологической схемы получения кормовой биомассы:

- *Сгущение суспензии микроорганизмов*. При этом концентрация биомассы повышается до 12 - 16 % АСВ. Для этого используют сепараторы, а также флокуляцию, коагуляцию, флотацию или декантацию.

- *Термообработка суспензии*. При нагревании микроорганизмов до температуры 75 - 85 °С в течение 10 - 40 мин происходит гибель штамма-продуцента и практически всей сопутствующей микрофлоры.

- *Концентрирование суспензии*. Проводят в отделении выпаривания до концентрации 23 - 25 % АСВ. Для этого используется трехкорпусная вакуум-выпарная установка: I корпус – 90 °С, II – 75 и III – 60 °С.

- *Сушка*. В этом отделении происходит образование готового продукта с влажностью ≈ 10 % (по массе). Для этого используются конвективные сушилки (распылительные, кипящего слоя, ленточные и барабанные).

- *Грануляция и сушка*. Обычно сухая биомасса, содержащая 8 - 10 % (по массе) влаги представляет собой готовый продукт и после упаковки направляется на склад к потребителю. Если продукт необходимо получить в виде гранул, то сухая и влажная (после выпарки) биомасса в соотношении 1:1 поступает в гранулятор. При этом влажная биомасса налипает на сухие частицы и вся масса влажностью 45 - 50 % движется в аппарате, формируя гранулы, которые затем подаются в сушилку кипящего слоя. Гранулы подсушиваются до остаточной влажности 8 - 10 % (по массе) горячим воздухом или топочными газами с температурой 260 - 300 °С;

– *Фасовка и упаковка готового продукта.* Сухая биомасса поступает в приемный бункер и фасуется в бумажные мешки с клапаном массой 25 - 30 кг. Эти мешки укладываются на специальные поддоны, которые отвозят их на склад или отгружают потребителю.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Каковы последствия недостатка или полного отсутствия белка в рационе животного?
- 2) Перечислите преимущества производства биомассы с помощью микробного синтеза.
- 3) Дрожжи и бактерии как нетрадиционные источники белка, их преимущества и недостатки.
- 4) Какие водоросли можно использовать в качестве кормовых добавок?
- 5) Грибы как перспективный источник кормового белка.
- 6) Перечислите сырьевые источники для синтеза микробного белка.
- 7) Парафины нефти как сырье для синтеза микробного белка.
- 8) Спирты как субстрат для микробного синтеза белка.
- 9) Использование растительной биомассы для культивирования продуцентов белка.
- 10) Молочная сыворотка как сырье для производства белковой биомассы.
- 11) Технология выращивания засевной культуры для получения кормовой биомассы.
- 12) Охарактеризуйте главную стадию (стадию ферментации) и последующие этапы технологической схемы производства кормовой биомассы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Блинов, В.А.** Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / В.А. Блинов, С.В. Ковалева, С.Н. Буршина. – Саратов: ИЦ «Наука», 2011. – 171 с. – ISBN 978-5-9999-0927-5
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. **Мотовилов, К.Я.** Экспертиза кормов и кормовых добавок: учебно-справочное пособие / К.Я. Мотовилов, А.П. Булато, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 336 с.
6. **Никульников, В.С.** Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретинин. – М.: Колос, 2007. – 544 с. – ISBN 978-5-10-003966-2
7. *Сельскохозяйственная биотехнология* / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
8. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
9. **Фаритов, Т.А.** Корма и кормовые добавки для животных: учебное пособие / Т.А. Фаритов. – СПб.: Лань, 2010. – 304 с. – ISBN 978-5-8114-1026-2
10. **Фисинин, В.И.** Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник / В.И. Фисинин, И.А. Егоров, И.Ф. Драганов. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 344 с. – ISBN 978-5-9704-1996-0

Дополнительная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Журналы: Ветеринария и кормление, Главный зоотехник, Животноводство России, Зоотехния, Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство, Кормопроизводство, Птицеводство, Свиноводство.
3. Адаптивное кормопроизводство: Международный научно-практический электронный журнал ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса; ссылка доступа – http://adaptagro.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=73&lang=ru
4. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
5. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
6. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 7

КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА

7.1. Кормовые препараты аминокислот

Учитывая высокую потребность сельскохозяйственных животных и птицы в белках, важными биодобавками следует считать аминокислоты, ибо дефицит аминокислот, нарушая биосинтез белка, тормозит рост и развитие, может вызвать различного рода заболевания. С этой целью применяют различные лизинпротеиновые препараты, например, липрот, а также глицин, метионин. Введение липрота в рацион бройлеров сокращает потребление корма животного происхождения в 2 раза, увеличивает привесы птицы на 10 - 20 %, способствует повышению яйценоскости кур-несушек, увеличению массы яиц и улучшению их инкубационных свойств. Глицин нормализует обмен веществ при возникновении транспортного стресса. Ряд положительных эффектов отмечен и при использовании «защищенного» метионина – повышение уровня молочного белка, удоя, снижение частоты кетозов, улучшение биохимических показателей крови и репродуктивных показателей, снижение в молоке числа соматических клеток.

Производство аминокислот. В настоящее время производство аминокислот составляет свыше 500 тыс. т в год, из них глутаминовой кислоты производится 200 тыс. т, метионина 160 тыс. т, лизина 50 тыс. т и т.д. Аминокислоты производятся как микробиологическим (~ 60%), так и химическим путем. Так, химическим синтезом получают D,L-метионин из акролеина, DL-триптофан из индола и нитроуксусного эфира, L-глутамат натрия из акрилонитрила, L-лизин из циклогексанона и др. Однако при химическом синтезе всегда образуются рацематы – смеси D-и L-аминокислот, для разделения которых нужна сложная и дорогостоящая очистка. D-аминокислоты являются балластом, т.к. не усваиваются организмом человека и животного, повышают расходные коэффициенты используемого сырья на 1 т продукции, некоторые из них токсичны. Исключение составляют глицин, у которого нет оптически активных изомеров и метионин, DL- формы которого усваиваются организмом в равной мере.

С 50-х годов XX в. известна способность ауксотрофных мутантов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* и др. к сверхсинтезу экстрацеллюлярных аминокислот. Это явилось основанием для создания крупнотоннажного производства L-аминокислот. Так, генноинженерные штаммы-продуценты на основе *E. coli* позволяют за 40 ч ферментации накапливать в среде до 30 г/л L- треонина, до 27 г/л L-пролина, до 22,4 г/л L-фенилаланина.

Известно два способа получения аминокислот: одноступенчатый и двухступенчатый. По первому способу мутантный полиауксотрофный штамм-продуцент аминокислоты культивируют на оптимальной для биосинтеза среде. Целевой продукт накапливается в культуральной жидкости, из которой его выделяют. В двухступенчатом способе на первой ступени микроб-продуцент аминокислоты культивируют в жидкой питательной среде, где происходит биосинтез предшественников аминокислоты (заготовка) и ферментов, катализирующих образование целевого продукта. На второй ступени целевой продукт (аминокислота) синтезируется с помощью этих ферментов.

Лизин в организме животных определяет биологическую ценность перевариваемого белка, способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция в клетки, улучшает азотистый баланс. В основном весь лизин, производимый в мире микробиологическим синтезом, расходуется на обогащение кормов

сельскохозяйственных животных и птицы. Он используется в виде жидкого концентрата лизина (ЖКЛ), кормового концентрата лизина (ККЛ), высококонцентрированных кормовых препаратов лизина.

7.2. Ферментные препараты

В последние годы большой популярностью стали пользоваться ферментные препараты. Так, мацеробациллин ГЗх обладает высокой пектаттрансэлиминазной и ксиланазной активностью. Его применение при откорме бычков увеличивает среднесуточный прирост на 15,4 %, снижает затраты кормов на 1 кг прироста на 13,4 %, оказывает выраженное стимулирующее влияние на микрофлору рубца, благоприятно влияет на переваримость питательных веществ и эффективность использования корма, на гематологические и биохимические показатели крови, на состояние здоровья молодняка и качество мясной продукции. Близкими в этом отношении оказались целловиридин Г20х, пектофоедин П10х, протосубтилин ГЗх и амилосубтилин ГЗх. Например, введение в рацион дойных коров ферментного препарата амилосубтилина ГЗх приводит не только к повышению среднесуточных удоев (на 6,1 - 12,3 %), но и к нормализации сложнейших биохимических процессов: глюконеогенеза и мочевинообразования. Такие мультиэнзимные композиции, как МЭК-1 и МЭК-2 способствуют повышению прироста живой массы телят молочного периода выращивания при снижении затрат кормов. Отечественная биотехнологическая промышленность выпускает и другие мультиэнзимные композиции (МЭК-СХ), которые оказались эффективными по следующим параметрам: лучшее переваривание поступающих питательных веществ, усиление углеводно-липидного и азотистого обменов, увеличение прироста живой массы телят и продуктивности коров, снижение затрат кормов.

Жидкая кормовая добавка фекорд Б, содержащая комплекс гидролитических ферментов – целлюлазу, ксиланазу и β -глюканазу, полученные при ферментации гриба *Trichoderma reesei*, а также смесь биомасс грибов *Trichoderma reesei*, *Aspergillus awamori* и бактерий *Bacillus subtilis*, стимулирует яйценоскость кур, способствует повышению живой массы цыплят, увеличению переваримости питательных веществ корма молодняком крупного рогатого скота.

Лабораторные и научно-хозяйственные опыты доказали целесообразность использования в качестве добавок к рационам сельскохозяйственных животных и птиц таких мультиэнзимных комплексов как авизим и порзим, ронозим, натуфос и натугрейн бленд, био-фид-вит и био-фит-плюс, роксазим G2-гранулят, олзайм и др.

Производство ферментных препаратов. Технологические процессы производства ферментных препаратов можно разделить на 2 группы: в первом случае ферментация ведется глубинным методом в жидкой питательной среде, во втором – используется поверхностная культура, растущая на специально подготовленной рыхлой и увлажненной питательной среде.

Основные этапы глубинного метода культивирования продуцентов ферментов:

- получение посевного материала: исходная культура продуцента → маточная культура, выращенная в колбах на качалке → посевная культура, выращенная в инокуляторе → посевная культура, выращенная в посевном аппарате. Объем посевного аппарата обычно составляет до 10 % от объема промышленного ферментатора;
- приготовление питательных сред;
- стерилизация питательных сред с помощью мембран или высоких температур;

- очистка воздуха до и после аэрирования;
- производственное культивирование.

Глубинный метод более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации, легче и проще осуществляется переход к большим масштабам производства. Этот процесс должен проходить в строго асептических условиях, а концентрация ферментов в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры.

При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Недостатками метода является необходимость иметь большую поверхность контакта рыхлой среды с воздухом, что часто отражает неинтенсивный характер процесса. Мойка, стерилизация, перемещение кювет с небольшой высотой слоя, их заполнение и освобождение требует больших затрат ручного труда. Выращивание культуры проходит в неасептических условиях. Преимущества поверхностного метода: конечная концентрация фермента на единицу массы среды более высокая, такие культуры легко выращивать и приводить в товарную форму, снижена потребность в электроэнергии и т.д. Культура микроорганизмов, выращенная поверхностным методом, и культуральная жидкость после глубинного культивирования содержит большое количество балластных веществ: биомассу продуцента, непотребленные компоненты среды, продукты метаболизма. Доля собственно ферментов составляет около 1 % для поверхностных и не более 0,1 % – для глубинных культур.

7.3. Витамины

Интенсивного роста и развития, высокой продуктивности и хорошо выраженного конституционального иммунитета удается добиться при оптимальном обеспечении организма животных витаминами: β -каротином, парааминобензойной кислотой, витамином U, витамином E. Показано, что введение повышенных доз витамина A в рацион коров способствует стабилизации в молоке фракционного состава казеина, сывороточных белков и устойчивости казеинкальцийфосфатного комплекса. Целесообразным оказалось использование повышенных доз витамина E при тепловых стрессах при выращивании бройлеров. Комплекс фолиевой и аскорбиновой кислот повышает продуктивность свиноматок, нормализует обменные процессы, стимулирует естественные защитные силы организма, а также инициирует многоплодие. Двойная норма витаминов B₁₂ и фолиевой кислоты оказывает положительное влияние на сперматогенез птицы, увеличивает объем и общее количество спермиев в эякуляте, что способствует повышению оплодотворяемости яиц и процента вывода цыплят. Более высоких показателей продуктивности и естественной резистентности животных можно добиться при комплексном использовании витамина C и протосубтилина ГЗх, витамина U и смеси ферментных препаратов пектофоептидина П10х и протосубтилина ГЗх, витамина K₄ и цеолита, витамина B₁₂ и кобальта.

Производство витаминов. Биотехнологическим путем производят витамин A, D, B₂, B₁₂, C и др.

Каротиноиды (предшественники витамина A) синтезируются пигментными микроорганизмами из рода *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* др. Всего известно около 500 каротиноидов, которые продуцируются бактериями, дрожжами и мицелиальными грибами. Они находятся в клеточной мембране микроорганизмов в виде сложных эфиров и гликозидов или в свободном состоянии – в липидных гранулах цитоплазмы.

В основе *витамина D* лежит скелет эргостерина, который находится в клеточных

мембранах эукариот. Так, пекарские или пивные дрожжи содержат 0,2-11 % эргостерина. Под влиянием УФО эргостерин трансформируется в витамин D₂, который легко переходит в D₃. Продуцентами эргостерина также являются аспергиллы и пенициллы. В них содержится 1,2 - 2,2 % эргостерина. Облученные сухие дрожжи используют в животноводстве. В них содержится не менее 46% сырого белка, незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, триптофан.) и 5000 МЕ витамина D₂/г.

Витамин B₂ (рибофлавин) продуцируется бактериями, дрожжами и нитчатými грибами. В настоящее время получают до 0,5 г и более рибофлавина в 1 л среды.

Витамин С синтезируют все растения и животные, кроме обезьян и морских свинок, а также человека. Микроорганизмы витамин С не синтезируют и в нем не нуждаются. Аскорбиновую кислоту получают химико-ферментативным способом. Так, некоторые виды уксуснокислых бактерий образуют полупродукт аскорбиновой кислоты – L-сорбозу. Затем проводят химическую стадию. В результате получается 2-кето-L-гулоновая кислота. Ее подвергают энוליзации и трансформируют в L-аскорбиновую кислоту. L-сорбозу также получают ферментацией *Gluconobacter oxydans* на средах, содержащих сорбат, кукурузный или дрожжевой экстракт при интенсивной аэрации. Выход L-сорбозы составляет 98 % за 2 суток. Культивирование проводят в периодическом или непрерывном режиме.

Витамин B₁₂ (цианкобаламин) продуцируют пропионовые бактерии – *Propionibacterium var. Shermanii*. На ацетобутиловой и спиртовой бардах с добавлением кобальта и метанола получают кормовой препарат, который содержит витамин B₁₂ и другие ростовые факторы. Здесь биообъектом является смешанная культура метаногенных бактерий.

7.4. Пробиотики

Пробиотики – это живые, специально подобранные штаммы микроорганизмов или специфические субстанции микробного, растительного или животного происхождения. Иными словами, пробиотики – это биологические препараты, представляющие собой стабилизированные культуры симбионтных микроорганизмов или продукты их ферментации, которые способствуют росту последних и обладают разносторонним действием (таблица 1).

Так, в первые дни жизни животных пробиотические препараты вводят в заменители молока. Разработаны технологии приготовления сухих заменителей цельного молока с добавлением молочнокислых бактерий, ацидофильной палочки, пропионовокислых бактерий. Испытано профилактическое действие препарата галако (смесь гамма-глобулина, живых лактобацилл и непатогенных штаммов кишечной палочки, высушенных лиофильно с сухим молоком в качестве наполнителя) при заболеваниях пищеварительного тракта телят. Дача ацидофильного молока цыплятам, пороссятам и телятам, способствует не только снижению кишечных заболеваний, но и увеличению привесов. Аналогичные данные получены, если цельное молоко заквашивали молочнокислыми бактериями (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis* и *L. acidophilus* в соотношении 1:1:1:1).

Пробиотические микроорганизмы применяют и для приготовления кормосмесей. Так, при обработке корма для свиней закваской Леснова происходит биотрансформация клетчатки микроорганизмами, синтезируются витамины группы В, а также D, Е, К, микробный белок. Все это повышает у животных переваримость сырого протеина и сырого жира, сухого и органического вещества, улучшает использование азота, увели-

чивает мясную продуктивность. Приведем другой пример. При использовании живой культуры слизистых бацилл (*Bac. mucilaginosus*) для силосования кукурузы получен высококачественный силос, который повышает молочную продуктивность первотелок на 3,1 %, а содержание белка в молоке – на 3,6 %.

Таблица 1 - Спектр активности пробиотиков

Действие	Процессы, обеспечивающие это действие
Подавление роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов	Синтез веществ, обладающих антибиотическими свойствами (антибиотики, лизоцим, пептиды с антибиотическими свойствами и др.), снижение рН среды, высокая конкурентная способность в процессе размножения
Нормализация пищеварения	Синтез пектолитических, протеолитических ферментов, липазы
Стимуляция неспецифической резистентности макроорганизма	Стимуляция лимфоцитов, макрофагов, индукция эндогенного и γ -интерферона, увеличение содержания гамма-глобулиновой фракции крови
Антитоксическое действие	Дезинтеграция высокомолекулярных белков. Способность связывать тяжелые металлы
Антиаллергическое действие	Расщепление аллергенов на биологически инертные субъединицы
Восстановление эндогенной микрофлоры, коррекция микробиоценоза	Филогенетическая общность представителей нормальной симбионтной микрофлоры
Синтез заменимых и незаменимых аминокислот и витаминов	Экзоцеллюлярная продукция треонина, глутаминовой кислоты, аланина, валина, тирозина, гистидина, орнитина и др.
Выведение тяжелых металлов и радионуклидов	Способность к повышенной сорбции тяжелых металлов и радионуклидов в сочетании с быстрой элиминацией
Противоопухолевая и антиметастатическая активность	Стимуляция естественных киллерных клеток и Т-лимфоцитов, стимуляция макрофагов

Показано, что пропиовит созданный на основе пропионовокислых бактерий усиливает рост и повышает продуктивность птицы, поросят, телят, на 2 - 12 %, облегчает и ускоряет адаптацию животных к различным стресс-факторам. Он эффективен для профилактики желудочно-кишечных заболеваний и при нарушениях минерального обмена. Препараты на основе ацидофильной палочки положительно влияют на яйценоскость, качество яиц и микрофлору пищеварительного тракта птицы. Лиофилизированной культурой ацидофильной палочки является препарат биобактон. Использование биобактона увеличивает сохранность поросят-гипотрофиков, на 3 - 11 %, скорость роста, на 5 - 7 %, нормализует основные показатели периферической крови, способствует снижению затрат на приобретение кормов. Применение культуры молочнокислого стрептококка повышает устойчивость поросят к кишечным болезням. У телят отмечено увеличение живой массы тела, в среднем на 5,3 %, уменьшение частоты диареи, снижение падежа.

Высокую практическую значимость в АПК, в частности в животноводстве, имеют и другие монокомпонентные пробиотики: лактоамиловорин на основе чистой культуры антагонистического штамма лактобациллы, выделенной из химуса слепой кишки поросят, бифидосодержащий препарат бифинорм, целлобактерин, представляющий собой ассоциацию целлюлозолитических микроорганизмов, выделенных из нормальной мик-

рофлоры пищеварительного тракта молодняка жвачных животных, каротинобактерин на основе штамма *Rhodococcus* ВКПМС-916, токарин на основе токоферолсинтезирующего штамма № 100, стрептофагин, содержащий бактериофаги, бактисубтил на основе *B. cereus* IP 5832 и др. Показано, например, что введение в комбикорма для гусят лактоамиловорина оказало благоприятное влияние на эритропоэз, синтез гемоглобина и обеспечение кислородом обменных процессов. Валовой сбор перопухового сырья увеличился на 7 %, улучшилось качество мяса, в котором стало больше белка, меньше жира и холестерина. Скармливание этого пробиотика оказывает положительное влияние и на биохимические процессы в печени цыплят.

Включение лактоамиловорина в рацион хряков-производителей улучшает их репродуктивные качества, оплодотворяемость свиноматок спермой таких хряков возрастает до 83 - 90 %, против 77 % в контроле. Скармливание лактоамиловорина холостым свиноматкам увеличивает выход живых поросят на 10,8 % и массу гнезда – на 8,9 %. Лактоамиловорин обеспечивает профилактическое (до 86 %) и лечебное действие при диарейных заболеваниях поросят и телят, повышает их сохранность до 95 - 100 % и увеличивает прирост живой массы, на 20 - 30 %.

Приведем еще несколько примеров. Пробиотик целлобактерин предназначен в качестве кормовой добавки для животноводства. Он повышает эффективность использования грубых кормов. Введение в рацион кур-несушек пробиотика целлобактерина позволяет значительно увеличить продуктивность, общую массу снесенных яиц и не уступает по эффективности кормовым ферментным препаратам. При добавлении в корм пороссятам целлобактерина среднесуточный прирост их живой массы был выше на 26,8 %, чем у группы аналогов, выращенных по стандартной технологии с применением смеси кормовых антибиотиков медикато. Сохранность опытных поросят составила 83,4 %, а контрольных – 75,3 %. Ежедневное скармливание бычкам сухого целлобактерина увеличило общее количество микроорганизмов и простейших в рубце и их активность, способствовало лучшему поеданию грубых кормов, переваримости сухого вещества и, как следствие, увеличению среднесуточного привеса.

Многие авторы считают весьма перспективным обогащение кишечной микрофлоры животных не одной культурой, а целым рядом специально подобранных штаммов, иными словами использование комплексных пробиотиков. Так, разработаны и внедрены следующие поликомпонентные пробиотические препараты: субтилис и биод-5, содержащие различные штаммы *B. subtilis* и *B. licheniformis*, пропиацид на основе пропионовокислых и ацидофильных микроорганизмов, лактобифадол, в состав которого включены ацидофильные и бифидобактерии, лактицид на основе *L. acidophilus*, *L. fermentum* и *Str. faecium*, СБА, содержащий бифидобактерии, фекальный стрептококк и ацидофильную палочку, лаком, в состав которого включены *L. acidophilus*, *P. shermanii*, *Str. faecium* и *Str. diacetylactis*, выпущены опытные партии препарата реалак, содержащего *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Bif. globosum* и автолизат дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и др.

На основе новейших биотехнологических разработок создана натуральная кормовая добавка естур, состоящая из живых культур *Saccharomyces cerevisiae* высокой ферментативной активности, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, а также ферментов, аминокислот, минералов, полисахаридов. Применение этого пробиотика увеличивало среднесуточный прирост телят, на 10,3 - 21,9 %, среднесуточный удой молока, на 10,7 - 11,3 %, а его жирность, на 0,32 - 0,52 %, способствовало снижению числа соматических клеток в молоке, в среднем, в 2,3 раза. В рубце таких телят увеличивалось общее количество микроорганизмов

на 74,3 %, инфузорий – на 41,2 %.

7.5. Использование отходов технических производств в кормлении животных

Производства по переработке пищевого сырья дают большое количество отходов, которые, в том числе и после биотехнологической модификации, представляют определенную кормовую ценность для сельскохозяйственных животных и птицы.

Крахмальное производство. При производстве крахмала из картофеля клубни растирают на терках в кашу. Далее из нее на ситах вымывают водой крахмал. При этом зерна крахмала проходят с водой через сито, а на сите остаются клеточные оболочки с небольшим количеством крахмала. Это *мезга*. Из 100 ц картофеля в среднем получается 75 ц мезги. Мезга содержит до 86 % воды, 10 - 12 % безазотистых экстрактивных веществ, немного клетчатки, протеина и золы. Мезгу скармливают в основном крупному рогатому скоту и свиньям в сыром или вареном виде от 10 до 30 кг в день. Возможно силосование мезги. Мезга влажностью 70 - 75 % силосуется хорошо, особенно с применением закваски из молочнокислых бактерий.

Спиртовое производство. Технологический процесс производства спирта состоит в осахаривании крахмала солодом и в переводе сахара в спирт при брожении под действием дрожжей. Результат брожения – зрелая бражка, из которой отгоняют спирт и в остатке получают *барду*. В среднем из сухого вещества сырья (крахмалистый продукт, солод и дрожжи) в барду переходит около трети. В зависимости от материала, взятого для приготовления спирта (картофель, рожь, кукуруза, патока), кормовое достоинство барды различно. Все виды барды содержат в свежем состоянии 92 - 94 % воды. Сухое вещество хлебной и картофельной барды богато белком (20 - 25 %), бедно жиром и клетчаткой, в небольшом количестве содержит свободные органические кислоты. Барда, получаемая при переработке на спирт патоки, отличается высоким содержанием небелковых азотистых соединений и минеральных веществ, особенно калия. Хлебную и картофельную барду используют преимущественно для кормления крупного рогатого скота. Взрослым животным дают 70 - 80 л барды в сутки, молочным коровам – 25 - 35 л, рабочим лошадям – 12 - 18 л. Скармливают барду обычно свежей, так как на воздухе она быстро закисает, покрывается плесенью, загнивает. Свежая барда содержит 0,4-0,5% свободных молочной и уксусной кислот, рН – 4,2-4,4. При такой активной кислотности барда может сохраниться, если ее изолировать от воздуха. Консервируют барду путем силосования. Свежую барду с завода направляют по бардопроводу в ямы или траншеи, при этом жидкость уходит в почву или ее сливают после отстоя, а гуща остается в яме. Яму постепенно заполняют доверху сгущенной бардой. Для изоляции от воздуха над поверхностью осевшей гущи оставляют слой жидкости (около 15 см). В силосованной барде содержание сухого вещества повышается до 18 - 22 %. Барду можно силосовать с сухими кормами, например, с соломенной резкой.

Пивоваренное производство. Производство пива складывается из приготовления солода, варки сусла и его сбраживания. Солод готовят из ячменя. При этом зерно намачивают и проращивают в течение 7 - 10 дней. Проросшие зерна ячменя – зеленый солод – высушивают, с них удаляют ростки, которые содержат вещества, ухудшающие вкус пива. При высушивании ростки становятся хрупкими и легко сбиваются трением зерен друг о друга во вращающемся цилиндре. Отбитые ростки отделяют просеиванием на ситах и используют как кормовое средство под названием *солодовые ростки*. Солодовые ростки содержат около 11 % воды, до 24 % сырого протеина. По общей питательности солодовые ростки значительно уступают зерну и отрубям. Солодовые ростки со-

держат бетаин и холин. Они придают продукту слегка горьковатый вкус, из-за которого животные не всегда сразу и охотно едят данный корм, но постепенно к нему привыкают. Скармливают ростки размоченными, в виде густой каши молочным коровам, молодняку и свиньям.

Пивная дробина в сыром виде содержит около 75 % воды. Ее сухое вещество состоит из плодовых и зерновых оболочек и прочих остатков ячменя, нерастворимых в воде. Так как на приготовление пивного сусла идут углеводы зерна, то сухое вещество пивной дробины значительно богаче протеином (около 25 %), чем исходный материал. Свежую пивную гущу по 12 - 16 кг в сутки скармливают молочному скоту, свиньям. При хранении пивная гуща быстро портится. На крупных заводах свежую пивную дробину иногда сушат. Сушеная дробина является хорошим концентрированным кормом. Она близка по составу и общей питательности к пшеничным отрубям.

Пивные дрожжи – ценный кормовой продукт пивоваренного производства. В свежем виде они содержат около 85 % воды. В сухом веществе около 50 % составляет протеин. Сухие дрожжи занимают первое место среди кормов по содержанию легкопереваримого белка. Белок дрожжей по биологической ценности считают близким к животным белкам. Дрожжи служат источником витаминов комплекса *B*. В дрожжах содержатся ферменты (протеазы, нуклеазы и др.), которые возбуждают аппетит животных. Сырые дрожжи дают молочному скоту по 10 - 20 кг в сутки, свиньям – 1 - 5 кг. Сухие дрожжи считаются хорошим кормом для всех животных, особенно для свиней: свиньям дают 200 - 600 г в день, молочным коровам – до 2 кг.

Свеклосахарное производство. При производстве сахара свеклу измельчают в тонкие стружки, которые загружают в большие сосуды – диффузоры. Там из свекольной стружки сахар вымывается горячей водой. Получается диффузионный сок, который идет на дальнейшую переработку. В диффузорах остаются диффузионные остатки, или *жом*. Диффузионный сок сгущают увариванием в вакуум-аппаратах, пока из него не выкристаллизуется сахар. Получается густая масса – *утфель*. Она состоит из кристаллов сахара и светло-бурой липкой жидкости – *патоки*. Сахар от патоки отделяют в центрифугах. При этом последовательно получается сахарный песок разных сортов: от желтого до белого. Стекающая с желтого песка густая темная патока, содержащая труднокристаллизующийся сахар, является отходом производства и продается с заводов как кормовой продукт. Таким образом, кормовая патока является сгущенным и в значительной степени обессахаренным свекловичным соком. Свежий жом содержит до 93 % воды. Его сухое вещество состоит преимущественно из углеводов, хорошо переваримо. По общей питательности жом близок к наиболее водянистым корнеплодам. Жом очень беден фосфором, в нем отсутствуют витамины *A* и *D*. Содержание кальция удовлетворительное. На заводах жом складывают в ямы, где он подвергается самозаквашиванию. Улучшить качество такого корма и снизить потери питательных веществ можно частичным обезвоживанием жома (до влажности 70 - 75 %), внесением чистых культур молочнокислых бактерий, устройством хороших ям и тщательной изоляцией жома от воздуха. Кислый жом богаче свежего сухим веществом (около 12 %) и содержит много органических кислот. Он охотнее поедается скотом, чем сладкий свежий. Некоторые заводы сушат жом, снижая содержание воды в нем до 10 - 12 %, такой продукт хорошо хранится, но беден белком (3,6 %) и поэтому не может заменить концентрированные корма (отруби, жмыхи, зерно). Как свежий, так и кислый жом используют для откорма скота: в среднем в сутки животные могут получать 50 - 60 кг продукта, сушеного жома дают молочным коровам 4 - 6 кг в зависимости от удоя.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Значение аминокислот в рационе сельскохозяйственных животных и птицы.
- 2) Какие аминокислоты используются для обогащения кормов для сельскохозяйственных животных и птицы?
- 3) Биотехнологические аспекты получения аминокислот.
- 4) Какие ферментные препараты используются в качестве кормовых добавок к рационам сельскохозяйственных животных и птицы?
- 5) Биотехнологические особенности производства ферментных препаратов.
- 6) Роль ферментных препаратов в рационе сельскохозяйственных животных и птицы.
- 7) Целесообразность обогащения кормов для сельскохозяйственных животных и птицы витаминами.
- 8) Какие витамины производят микробиологическим путем?
- 9) Дайте определение термину «пробиотики».
- 10) Какое действие оказывают пробиотики на организм сельскохозяйственных животных и птицы?
- 11) Приведите примеры пробиотических препаратов, используемых в животноводстве и птицеводстве.
- 12) Использование отходов крахмального производства в кормлении сельскохозяйственных животных.
- 13) Какие отходы спиртового производства представляют кормовую ценность?
- 14) Какие кормовые продукты дает пивоваренное производство?
- 15) Какие отходы свеклосахарного производства являются кормовыми продуктами?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Блинов, В.А.** Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / В.А. Блинов, С.В. Ковалева, С.Н. Буршина. – Саратов: ИЦ «Наука», 2011. – 171 с. – ISBN 978-5-9999-0927-5
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. **Мотовилов, К.Я.** Экспертиза кормов и кормовых добавок: учебно-справочное пособие / К.Я. Мотовилов, А.П. Булато, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 336 с.
6. **Никульников, В.С.** Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретинин. – М.: Колос, 2007. – 544 с. – ISBN 978-5-10-003966-2
7. **Сельскохозяйственная биотехнология** / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
8. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
9. **Фаритов, Т.А.** Корма и кормовые добавки для животных: учебное пособие / Т.А. Фаритов. – СПб.: Лань, 2010. – 304 с. – ISBN 978-5-8114-1026-2
10. **Фисинин, В.И.** Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник / В.И. Фисинин, И.А. Егоров, И.Ф. Драганов. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 344 с. – ISBN 978-5-9704-1996-0

Дополнительная

1. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493-1236-2
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. **Блинов, В.А.** Биотехнология пивной дробины (консервирование и биотрансформация) / В.А. Блинов, И.А. Сазонова, Е.Н. Зеленцова. – Саратов: «Контур-Про», 2006. – 65 с.
5. **Блинов, В.А.** ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.
6. **Ситников, В.В.** Использование микроорганизмов-пробионтов в выращивании птицы: монография / В.В. Ситников. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2010. – 106 с. – ISBN 978-5-7011-0586-5
7. Журналы: Ветеринария и кормление, Главный зоотехник, Животноводство России, Зоотехния, Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство, Кормопроизводство, Птицеводство, Свиноводство.
8. Адаптивное кормопроизводство: Международный научно-практический электронный журнал ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса; ссылка доступа – http://adaptagro.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=73&lang=ru
9. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
10. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
11. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 8

ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

8.1. История применения культур клеток животных

В первом десятилетии XX века впервые выделили клетки из тканей организма высших животных и создали условия для их роста и воспроизводства в искусственных условиях (*in vitro*). Позднее стало возможным выращивание и репродукция в таких клетках вирусов; показана возможность получения в клетках животных больших количеств вирусного материала для применения в вакцинных препаратах; стало возможным вставить в клетки специфические экзогенно полученные гены и получить их экспрессию; подтверждена возможность выращивания из одиночной клетки целой популяции.

К настоящему времени разработаны методы культивирования клеток и тканей животных на искусственных жидких и твердых средах в пробирках, чашках Петри, флаконах. Культура клеток позволяет решать фундаментальные научные проблемы генетики, физиологии, биохимии. Для культивирования используют клетки опухолевых тканей, различных органов, лимфоциты, фибробласты, эмбрионы и т.п.

Применение культуры клеток животных для практических целей началось впервые с работ, в которых была показана возможность выращивания вирусов в культивируемых клетках. Для этого в 1949 г. были использованы клетки почек взрослых обезьян, клетки куриного эмбриона.

8.2. Основные характеристики клеток животных

Рост – представляет собой увеличение биомассы. Достигается за счет увеличения средней массы клетки (гипертрофия) или числа клеток (гиперплазия). Масса клетки удерживается в строго определенных пределах регуляторными факторами, поэтому в практической технологии термин «рост» подразумевает пролиферацию, то есть увеличение числа клеток.

Выделяют следующие регуляторные агенты: *наследственные* – осуществляют внутриклеточную регуляцию при решении вопроса о том, будет или нет происходить митоз (например, масса и структура клетки); *межклеточные* – действуют внутри популяции (например, величина пространства, питательные факторы); *межпопуляционные* – осуществляют регуляцию между популяциями (например, гормоны, стимуляторы роста и ингибиторы).

Специализация клеток – благодаря этому свойству, формируются индивидуальные ткани с конкретными функциями.

Трансформация – изменение ростовых свойств культивируемых клеток. Это необратимый процесс. При этом клетки пролиферируют в условиях, неблагоприятных для нетрансформированных клеток.

8.3. Этапы культивирования клеток животных

1. Диссоциация тканей – при этом из организованных тканей получают одиночные клетки. Их затем используют для получения первичных культур, т.е. культур численно увеличивающихся клеток. В качестве источника первичных клеток используют: почки обезьян, собак, кроликов, куриных эмбрионов 14-дневного возраста; клетки легких эм-

бриона человека 12-16-недельного возраста и клетки почек такого эмбриона. Предпочтение отдается эмбриональным клеткам. При получении клеток от более старых доноров их урожай и качество снижаются, так как в их органах накапливается соединительная ткань.

Сначала ткань тонко измельчают с помощью гомогенизатора, путем продавливания ткани через сетку из нейлона или нержавеющей стали или нарезают скальпелем или ножницами. Содержимое разрушенных клеток захватывает интактные клетки, при этом образуются желатиноподобные агрегаты. Поэтому проводят дополнительную обработку этих агрегатов ДНК-азой.

Для предотвращения развития микробов-контаминантов растворы, которые используются при диссоциации ткани, должны содержать антибиотики широкого спектра действия (гентамицин, неомицин) или более специфичные антибиотики (фунгизон).

Для диссоциации тканей применяют гидролитические ферменты, которые разрушают внеклеточный матрикс: трипсин, проназу, коллагеназу, эластазу, диспазу, гиалуронидазу или смеси ферментов.

2. Сепарация клеток. При диссоциации получают смешанные популяции эндотелиальных, фибробластных и эпителиальных клеток. Для получения какого-то определенного типа кровяных клеток используют следующие методы:

- *Селективная обработка ферментами.* Так, в присутствии коллагеназы увеличивается доля эпителиальных клеток.
- *Специфические ингибиторы.* Так, например, этилмеркуритиосалицилат натрия и йодоуксусная кислота более токсичны для фибробластов.
- *Центрифугирование:* изопикническое центрифугирование – в градиенте плотности; зональное или дифференциальное центрифугирование – по скорости седиментации, т.е. по размеру.
- *Хроматография.*
- *Физические методы:* электрофорез; дифференциальное прикрепление клеток к стеклу (например, эндотелиальные клетки прикрепляются к стеклу быстрее фибробластов, а фибробласты – быстрее эпителиальных клеток); разделение клеток между двумя водными фазами полимера (например, система декстран-полиэтиленгликоль, в которой полиэтиленгликоль сосредотачивается в верхней, а декстран в нижней фазах).
- *Сортировка клеток* – для этого используют автоматы по сортировке и учету потока клеток (цитомеры), с их помощью можно различать и сепарировать клеточные органеллы, например хромосомы в метафазе.

3. Субкультивирование и сбор урожая. Для снятия монослоя клеток с субстрата применяются те же ферменты, что и для диссоциации тканей, чаще – трипсин. Перед добавлением трипсина клеточный пласт промывают фосфатно-солевым буферным раствором для удаления остаточных следов сыворотки.

Если жизнеспособные клетки не требуются (например, при сборе клеток для извлечения антигенов), то их собирают следующими способами: встряхивание со стеклянными бусами; соскабливание пласта шпателем или стержным с резиновым покрытием; применение ультразвука; применение детергентных препаратов; замораживание и оттаивание.

4. Подсчет общего числа клеток. Для этого используют гемоцитомеры; электронный метод; прямой метод – определение массы клеток по содержанию в них белков,

белкового азота или по сухому веществу при условии, если взятые клетки были полностью отмыты от сыворотки и других компонентов среды; косвенный метод – по изменению метаболических процессов; радиохимические методы.

5. Синхронизация роста. Для многих исследований требуются клетки в одной и той же фазе развития. Для получения таких клеток используют два метода:

- **Блокирование (индукция)** – при этом клетки блокируются в фиксированной точке жизненного цикла и накапливаются в данной фазе. Затем клетки высвобождают из образовавшегося блока (обычно промыванием) и далее обеспечивают их синхронное развитие. Для блокирования клеток применяют ингибиторы митоза (колцеид, винбластин); ингибиторы синтеза ДНК (тимидин, аметоптерин, 5-аминоурацил и гидроксимочевина). Частично синхронизируют клетки воздействием холодом, голоданием. Синхронизация обычно охватывает 20 - 50 % клеток. Увеличение достигается повтором блокирований.

- **Селекция (сепарация)** – при этом клетки извлекают из популяции физическими методами: митотическое «стряхивание» – основано на том, что во время митоза клетки монолоя округляются и слабее прикрепляются к субстрату и друг к другу; скоростное центрифугирование – при этом отсеlectionируют фракцию клеток одинакового объема и возраста. При этом синхронизируется 60-75% клеток.

6. Иммобилизация и микрокапсулирование клеток. Основная задача – стабилизация клеток и создание для них оптимальных условий. Клетки могут быть иммобилизованы адсорбцией; ковалентным связыванием; перекрестным связыванием; заключением в полимерные матриксы. Для этого используют желатин, полилизин, альгинат, агарозу. Такая техника обеспечивает защиту клеток при перевозке; длительное хранение клеток при 4°C; исключение иммунного отторжения трансплантированных клеток; защиту хрупких клеток (например, гибридом) от механических воздействий. При культивировании инкапсулированных клеток легче производить смену среды в ферментере; регулировать соотношение объемов клеток и питательной среды; выделять продукты, свободные от клеток.

7. Консервирование клеток животных. Консервирование позволяет сохранить нужный геном в биотехнологии; сохранить посевной материал высокого качества; длительно сохранить запас клеток, имеющих ограниченную продолжительность жизни и не выдерживающих большое число пассажей; обеспечить генетические исследования запасом родительских клеток; сохранить резервный фонд клеток на случай утраты основного фонда; не подвергать клетки субкультивированию до того времени, пока это непосредственно не потребуется; сберечь затраты труда, питательные среды, а также уменьшить риск контаминации; проводить эксперименты по слиянию клонов без спешки.

Клетки животных не переносят лиофильной сушки (сублимация). Практически утрачивают жизнеспособность при температуре ниже -25°C. Некоторые клетки выживают при -70°C и даже при -140°C. Наиболее распространено хранение клеток в жидком азоте (температура – -196°C). При этом клетки полностью стабильны.

В зависимости от скорости замораживания происходят последовательно или одновременно три явления образование кристаллов льда; удаление воды; повышение концентрации растворенных веществ. Повреждение клеток и утрату ими жизнеспособности могут вызвать образование внутриклеточного льда – это происходит при скорости

охлаждения выше 100°C/мин; высокая концентрация солей при пониженных скоростях охлаждения – менее 1°C/мин.

Чтобы избежать значительных градиентов температуры в замораживаемой смеси, применяют как можно меньшие объемы замораживаемого материала. Обычно это стеклянные ампулы емкостью 1 мл. Если объем замораживаемого материала слишком большой, то используют пластиковые мешки, применяемые для хранения крови. При этом замораживаемый материал распределяется тонким слоем по большой поверхности. Это обеспечивает лучшие условия для теплообмена.

8. Восстановление жизненных функций. При оттаивании культуры её следует разогреть со скоростью не менее 400°C/мин. Когда клетки оттают, ампулу открывают и ее содержимое вносят в среду для выращивания с температурой 37°C.

8.4. Способы выращивания клеток животных

Глубинное выращивание клеток в монослой. Направлено на получение наибольшей концентрации клеток в наименьшем объеме газовой фазы. При этом клетки животных размножаются, растут и развиваются в прикрепленном состоянии до тех пор, пока не сольются в монослой. Рост клеток в виде монослоя зависит от белков – фибронектинов (от лат. *fibro* – нить, *nectere* – связывать или соединять). Фибронектин – гликопротеин, обеспечивает межклеточную адгезию, прикрепление клеток к подложке, направляет их перемещение.

Прикрепление клеток зависит от следующих свойств субстрата: *гидрофильность* – адгезивные свойства более выражены для смачиваемых поверхностей; *протяженность* – поверхность субстрата должна быть больше нормальной длины клетки; *горизонтальность* – растущие клетки распространяются в направлении наименьшей кривизны субстрата. Например, если принять прикрепление клеток к агар-агару за единицу, то к полиэтилену они прикрепляются лучше в 8 раз, к резине – в 12 раз, к стеклу – в 16 раз, а к стали – в 20 раз.

В монослой выращивают клетки соединительной ткани (фибробласты), клетки почек кроликов, обезьян, собак, 10-14-дневных куриных эмбрионов. Выращивание проводят в строго асептических условиях при покачивании для омыwania большей площади культуральной среды. Клетки попеременно погружают в жидкую и газообразную фазу, при этом с избытком обеспечивается потребность в кислороде.

Во время культивирования клеток учитываются следующие параметры: *константные* – качество материала, форма и объем культиватора; *вариабельные* – скорость покачивания, качество и объем среды, тип клеток и размер посевного материала, pH и температура среды, снабжение кислородом и содержание CO₂ в культиваторе, окислительно-восстановительный потенциал, концентрация основных источников питания.

Глубинное выращивание клеток в суспензированных культурах. При использовании микроносителей, суспендируемых в питательной среде, площадь выращиваемых клеток увеличивается. Клетки закрепляются на их поверхности, а затем разрастаются в виде монослоя. В таких системах совмещаются монослойные и суспензионные культуры клеток животных.

Применяют следующие микроносители: положительно заряженные ДЕАЕ-сефадексы (комбинация высокомолекулярного полимера декстрана с ионообменными смолами); сефадексы с коллагеновым покрытием (высокомолекулярный полимер дек-

страна); отрицательно заряженный полистирол; полые стеклянные сферы; микроносители из пористого шлачного стекла и др. После выращивания клетки отделяют от микроносителей центрифугированием; фильтрованием; обработкой трипсином с последующим промыванием и сепарированием.

Данный метод применяется для получения вирусных вакцин (против бешенства, полиомиелита, ящура).

8.5. Питательные среды для выращивания клеток животных

Функции сред для выращивания клеток: поддержание необходимых для роста физико-химических условий; обеспечение клеток питательными веществами для синтеза клеточной биомассы и продуктов.

Среда культивирования может создавать следующие условия: для клонального роста, т.е. для роста одиночной клетки; массового выращивания клеток; образования целевого продукта; поддержания обмена веществ у неделящихся клеток.

Первоначально для культивирования клеток создавались комплексные среды на основе плазмы крови и других биологических жидкостей. Наиболее рациональным при выборе состава сред является уменьшение числа компонентов до минимума, необходимого для роста, т.е. создание так называемых минимальных сред.

Термин «питательное вещество» подразумевает вещество, которое поступает в клетки и используется как метаболический субстрат или кофактор. Известны незаменимые питательные вещества – это аминокислоты, витамины, растворенные газы, неорганические ионы, источники энергии.

Основной состав питательных сред:

Источники энергии – глюкоза, глютамин, фруктоза, галактоза, уридин и цитидин.

Аминокислоты. Для культивирования клеток незаменимыми считаются 13 аминокислот (аргинин, цистин, глютамин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, тирозин, валин). Потребность в них снижается, если в среде содержится достаточно заменимых аминокислот (аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, пролин, глицин, серин). Важное значение имеет баланс между аминокислотами.

Витамины. Для многих культивируемых клеток необходимы водорастворимые витамины (биотин, фолиевая кислота, никотинамид, пантотеновая кислота, пиридоксин, рибофлавин и тиамин). Например, аскорбиновая кислота увеличивает урожай интерферона при его получении из культур клеток человека на микроносителе. Информация о влиянии жирорастворимых витаминов (А, D, Е, К и др.) на культивируемые клетки весьма ограничена.

Неорганические ионы. Клеткам животных для роста требуется натрий, калий, кальций, магний, фосфат, бикарбонат, хлорид. Они необходимы для поддержания осмотического давления; создания потенциалов у мембран; регулирования рН (за счет буферности); способствуют прикреплению клеток к различным поверхностям; действуют как кофакторы для ферментатических реакций; от соотношения различных ионов, особенно ионов натрия и калия, зависит урожай клеток и скорость их роста.

Следовые элементы. Считают, что для животных клеток незаменимыми или полезными являются 15 элементов: Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn, Se, Cr, Ni, V, As, Si, Sn. Следовые элементы переходят в среды из химических соединений или из стекла (колбы, бутылки).

Липиды. Источник липидов – сыворотка. Она содержит белки, транспортирующие липиды: альбумин – переносит свободные жирные кислоты, и липопротеины – транспортируют фосфолипиды, триглицериды и холестерол.

pH и буферные растворы. Оптимальное значение pH для максимального роста клеток – 6,9-7,8. Для оптимизации pH применяют неорганические буферы (например, карбонатный буфер – $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$) или органические буферы (α -глицерофосфат).

Газы. Кислород – незаменимый элемент для роста клеток млекопитающих. Потребность в нем обеспечивают путем обдувания поверхности среды воздухом или смесью, содержащей 95% воздуха и 5% CO_2 . Двуокись углерода – растворяется в воде, служит источником бикарбоната. Для некоторых клеток оптимальна газовая смесь, содержащая 0,5-2,0% CO_2 .

Антибиотики. Наиболее часто применяют антибактериальные агенты – пенициллин, стрептомицин, гентамицин; противогрибковые агенты – амфотерицин, нистатин. Постоянное применение антибиотиков не желательно из-за выработки резистентных микроорганизмов; отрицательного влияния на рост и функции клеток; снижения урожайности, скорости роста и сохранимости клеток.

Неопределенные добавки – сыворотки эмбриона телят, новорожденных телят и лошадей. Функции сыворотки: является носителем для лабильных или нерастворимых в воде питательных веществ; связывает или нейтрализует токсины; содержит ингибиторы протеазы, которая инактивирует трипсин; способствует прикреплению клеток к субстрату; является источником незаменимых низкомолекулярных питательных веществ, гормонов и пептидных факторов роста; обладает защитным эффектом (например, при перемешивании). При использовании сыворотки возникают следующие проблемы: вариабельность состава; высокая стоимость и периодическая дефицитность; источник контаминации микоплазмами, бактериофагами, вирусами и др.; источник токсинов; модифицирование поверхности клеток вследствие адсорбции или внедрения сывороточных белков; невозможность точно определить питательность среды; осложнения при очистке продуктов; чрезмерный рост фибробластов в первичных культурах других типов клеток.

В бессывороточные питательные среды вводят и другие неопределенные добавки (пептоны, эмульсии яичного желтка, гидролизат лактальбумина, триптозный фосфат и молоко).

При выборе среды следует учитывать:

- *Любые данные* о предшествующем использовании; наиболее надежно применение той среды, которая ранее показала хорошие результаты для данного типа клеток.

- *Тип клеток.* Трансформированные и отселекционированные клеточные линии обычно относительно хорошо растут в более простой среде или требуют меньше сыворотки, чем нетрансформированные или первичные клеточные линии.

- *Обеспеченность материалом.* Специализированные предприятия обеспечивают широкий выбор традиционных сред и необходимый набор бессывороточных смесей (например, среда Искова). Должны быть также доступными ростовые факторы и добавки к бессывороточным средам.

- *Система культивирования.*

- *Стоимость.* Дороговизна сыворотки должна балансировать высокой стоимостью добавок к бессывороточным средам.

- *Точность химического состава.* Например, для ряда исследований предпочтительны бессывороточные среды.

Вопросы для самоконтроля

- 1) История применения культур клеток животных.
- 2) Разъясните понятия «рост клеток», «специализация клеток» и «трансформация клеток».
- 3) Перечислите этапы культивирования клеток животных.
- 4) Методы сепарации клеток животных.
- 5) Какие ферменты используют для диссоциации тканей?
- 6) Какие приемы используют для сбора урожая клеток и подсчета их общего числа?
- 7) Методы синхронизации роста клеток.
- 8) Иммобилизация и микрокапсулирование клеток: значение, приемы.
- 9) Консервирование клеток животных.
- 10) Технология восстановления жизненных функций клеток после консервирования.
- 11) Глубинное выращивание клеток в монослое.
- 12) Глубинное выращивание клеток в суспензионных культурах.
- 13) Какие факторы следует учитывать при выборе питательной среды для культивирования клеток животных?
- 14) Перечислите основные компоненты питательных сред для культивирования клеток животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М: Мир, 2002. – 589 с.
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
6. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. **Цыганский, Р.А.** Физиология и патология животной клетки: учебное пособие / Р.А. Цыганский. – СПб.: Лань, 2009. – 336 с. – ISBN 978-5-8114-0870-2

Дополнительная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
3. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
4. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 9

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ

9.1. Этапы технологии трансплантации эмбрионов

Биотехнология имеет особое значение в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Крупный рогатый скот относится к одноплодным видам млекопитающих. От одной коровы можно получить в лучшем случае одного теленка в год. Однако в ее яйчнике содержатся сотни тысяч незрелых половых клеток (ооцитов). Они представляют огромный генетический резерв. Ускорить воспроизводство скота можно при переходе к нетрадиционным способам увеличения плодовитости. В последнее время приобрела практическое значение трансплантация эмбрионов. Использование этого метода в сочетании с длительным хранением семени в замороженном состоянии позволяет получить десятки тысяч потомков от одного производителя в год и освободить генетически выдающихся самок от необходимости вынашивания плода и вскармливания потомства. Суть метода состоит в том, что самок стимулируют с целью увеличения выхода яйцеклеток, которые затем извлекают на стадии ранних зародышей и пересаживают менее ценным в генетическом отношении реципиентам.

Технология трансплантации эмбрионов включает следующие этапы:

Отбор доноров. В качестве коров-доноров отбирают матерей потенциальных племенных быков. На первом этапе племенная ценность донора оценивается по главным признакам молочного скота – по уровню молочной продуктивности и жирности молока. На втором этапе число признаков в зависимости от цели селекции расширяется (форма вымени и сосков, свойства молокоотдачи, резистентность, крепость костяка и копыт, тип и воспроизводительные качества). Предпочтение отдают коровам, которые сохранили в течение трех отелов стабильную воспроизводительную способность. От таких коров можно регулярно получать эмбрионы через каждые два месяца. У коров-доноров при всех отелах должны отсутствовать осложнения (мертворождаемость, задержание последа, послеродовые заболевания половых органов).

Вызывание суперовуляции. В группу доноров переводят только тех коров, которые положительно реагируют на введение гормонов. Для стимуляции множественной овуляции используют: **а)** гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (СЖК) в сочетании с простагландинами и другими биологически активными веществами. Вводят однократно. Этот способ позволяет вызывать суперовуляцию примерно у 70 % коров; **б)** фолликулостимулирующий гормон ФСГ или его комбинация с лютеинизирующим гормоном ЛГ в соотношении 5:1. Вводят многократно.

Оптимальный результат суперовуляции – выход из яйчника в воронку яйцепровода 10 - 20 яйцеклеток. Эмбрионы можно получить менее чем от половины первоначально отобранных потенциальных коров-доноров. Хорошими донорами считают коров, которые после многократных суперовуляций имеют хорошую реакцию яйчника и производят большое число пригодных для пересадки эмбрионов за одно вымывание.

Кормление доноров должно быть таким, чтобы они находились в хорошем физиологическом состоянии. Рацион коровы-донора должен быть сбалансированным по основным питательным веществам, и особенно по аминокислотам и микроэлементам.

Искусственное осеменение коров-доноров. Для этого используют сперму только выдающихся быков-производителей, достоверно оцененных по качеству потомства. Коров осеменяют дважды: первый раз при начале появления половой охоты и второй – через 12 - 24 часа. Со дня осеменения начинается отсчет развития эмбрионов *in vitro*.

Извлечение эмбрионов. Возможно три способа:

- *Извлечение эмбриона после убоя коровы-донора* – самый простой и надежный способ. Этот способ практиковался только на первых этапах освоения метода трансплантации. В настоящее время он не используется из-за потери генетически ценной коровы-донора.

- *Хирургический способ* – эмбрионы извлекают между 7-8-ми сутками после первого искусственного осеменения (*разрез верхнего свода влагалища, лапаротомия по белой линии живота и лапаротомия в области голодной ямки*). Этот способ трудоемкий, дорогостоящий, им нельзя пользоваться многократно. В настоящее время применяется редко, главным образом в научных целях.

- *Нехирургический способ.* Преимущество – простота манипуляций. Для этого не требуется специального операционного помещения. Эмбрионы можно извлекать непосредственно в производственных условиях. При правильном применении этого способа воспроизводительная способность доноров не нарушается. Это позволяет многократно использовать генетически ценных коров-доноров для получения от них большого числа потомков. Эмбрионы извлекают под местной анестезией путем вымывания (5 - 8 раз). Длительность манипуляции – 20 - 50 минут. После вымывания эмбрионов в матку вводят раствор антибиотика. В среднем из вымытых яйцеклеток до 25 % оказываются неоплодотворенными или дезинтегрированными.

Кратковременное культивирование и хранение эмбрионов. Манипуляции с ранними эмбрионами, находящимися на предимплантационных стадиях развития, т.е. от момента их получения до введения в рога матки реципиента, занимают от 1 до 5 часов. В этот период нужно создать оптимальные условия, обеспечивающие сохранение их биологических качеств. Кратковременное хранение эмбрионов дает также возможность транспортировать их в другие хозяйства.

Эмбрионы КРС можно сохранить путем пересадки их в яйцепровод самок других видов млекопитающих, например, крольчих. Недостаток метода – трудоемкость и возможные потери зигот при их переносе.

В настоящее время распространен метод краткосрочного хранения эмбрионов *in vitro*. При этом жизнеспособные эмбрионы переносят в питательные среды с температурой 37 °С. В состав сред включены растворы солей, аминокислоты с бикарбонатным ионом как буферным агентом. Он обеспечивает pH в пределах 7,2 - 7,6. При этом биологические качества эмбрионов сохраняются до 95 часов.

Оценка эмбрионов. Производится несколькими методами: а) Морфологический метод – при этом основное внимание обращают на форму зиготы, равномерность дробления и т.д. б) Оценка по адсорбционным свойствам оболочек и цитоплазмы к различным красителям (например, синьке Эванса). в) Гистохимические методы – основаны на специфических реакциях структурных элементов и веществ клеток к различным красителям.

При оценке качества эмбрионов в нашей стране принята 5-балльная шкала с учетом следующих показателей: соответствие стадии развития эмбриона его возрасту; пра-

вильность формы прозрачной оболочки и ее целостность; состояние цитоплазмы и др.

Идеальный эмбрион должен быть компактным, сферической формы, с однородной окраской, с клетками одинаковой величины и т.д. Эмбрионы с замедленным развитием выбраковываются. Наиболее пригодными для трансплантации являются эмбрионы, которые извлечены из матки коровы-донора на 7 - 8 сутки после первого осеменения.

Пересадка эмбрионов реципиентам. В качестве реципиента отбирают гинекологически здоровых коров после двух-трех нормальных половых циклов; продуктивные, племенные и породные качества роли не играют. Основное условие хорошего приживания эмбрионов – синхронность проявления половой охоты у доноров и реципиентов.

В настоящее время пересадка эмбрионов реципиентам производится следующими способами:

- *Хирургический способ* – это эффективность 60 - 70 %, а число телят – 3 - 4 на донора. Этот способ использовали в основном до середины 70-х годов. Однако он требует больших затрат, его трудно применять в производственных условиях. Из-за возможных травм его нельзя многократного использовать.

- *Нехирургический способ* – прост, экономичен, возможно многократное использование реципиента. Разработано несколько способов нехирургической пересадки эмбрионов. Метод основан на введении эмбриона в рог матки через шейку. Аппликацию зародышей – 50 - 60 %.

Эффективность трансплантации повышается при пересадке двух эмбрионов, по одному в каждый рог матки. Это позволяет получить двойные отелы. При пересадке двух эмбрионов в каждый рог матки частота двоен составляет 55 - 60 %, а при естественном многоплодии коров – всего 2 %. Также можно пересаживать эмбрион и оплодотворенной корове. При этом приживляемость эмбриона составляет 50 %.

Консервация эмбрионов. Самый эффективный метод – глубокое замораживание (криоконсервация) в жидком азоте при температуре -196 °С. Долговременное хранение глубокозамороженных эмбрионов имеет преимущества: **а)** пересадки могут быть проведены в любое время независимо от сроков взятия эмбрионов, поэтому нет необходимости в содержании больших групп реципиентов. В результате повышается рентабельность трансплантации; **б)** возможно создание эмбриобанков от генетически ценных животных. Это важно для сохранения генофонда редких и исчезающих пород, при транспортировке эмбрионов.

Выживаемость эмбрионов составляет 90 %, а стельность коров-реципиентов после нехирургической пересадки находится 50 - 55 %.

Эмбрионы замораживают в пробирках 50×6 мм или в ампулах вместимостью 1 мл. В них вносят 1 - 4 эмбриона от одного донора и 0,4 мл раствора криопротектора (например, 10 % раствор глицерина). Затем ампулы запаивают на пламени газовой горелки.

Возможно два режима охлаждения: **1)** Ампулы или пробирки охлаждают с 20 до -6 °С со скоростью 1 °С в минуту, проводят кристаллизацию, охлаждение со скоростью 0,3°С в минуту и погружают в жидкий азот. **2)** Охлаждение от -7 до -35 °С со скоростью 0,3 °С в минуту; от -35 до -38 °С со скоростью 0,1 °С в минуту и погружение в жидкий азот.

Оттаивание эмбрионов производится на водяной бане с температурой 25 или 37 °С в течение 10 - 12 секунд.

9.2. Оплодотворение яйцеклеток вне организма животного

Разработка системы оплодотворения и обеспечения ранних стадий развития эмбрионов млекопитающих вне живого организма (*in vitro*) имеет большое значение для решения ряда научных задач и практических вопросов по повышению эффективности разведения животных.

Оплодотворение яйцеклеток млекопитающих in vitro включает следующие этапы:

1. Созревание ооцитов *in vitro*. Ооциты получают из яичников коровы после убоя животных. Яичники доставляют в лабораторию в термостатированном контейнере в течение 1,5 - 2 часов. Там их дважды промывают свежим фосфатным буфером. Ооциты извлекают из фолликулов путем отсасывания или разрезания яичников на пластинки. Ооциты собирают в среду ТСМ 199 с добавлением 10 % сыворотки крови от коровы в охоте, затем дважды промывают и отбирают для дальнейшего созревания *in vitro* ооциты с компактным кумулюсом и однородной цитоплазмой.

В последнее время разработан способ прижизненного извлечения ооцитов из яичников коров с помощью ультразвукового прибора или лапароскопа. При этом ооциты отсасывают из фолликулов, диаметр которых не менее 2 мм, 1 - 2 раза в неделю от одного и того же животного. В среднем получают однократно 5-6 ооцитов на животное. Для созревания *in vitro* пригодно менее 50% ооцитов.

Отобранные ооциты созревают в течение 24 часов в среде ТСМ 199 с добавлением 20 % обработанной теплом сыворотки крови от коровы в охоте, гранулезных клеток и небольшого количества антибиотиков (пенициллина, стрептомицина).

2. Капацитация сперматозоидов. До того как сперматозоид приобретает способность к оплодотворению, в нем должны произойти некоторые физиологические изменения. Этот процесс получил название капацитация.

Капацитация включает две фазы: **1)** изменение мембраны спермия (собственно капацитация); **2)** акросомная реакция.

Разработаны следующие методы капацитации спермиев: использование среды с высокой ионной силой; использование гликозаминогликана гепарина.

3. Оплодотворение *in vitro* и обеспечение ранних стадий развития эмбрионов (на примере КРС). Оплодотворение *in vitro* проводят в капле модифицированной среды Тироида. После созревания *in vitro* ооциты частично очищают от окружающих кумулюсных клеток и переносят в микрокапле по пять ооцитов в каждой. Суспензия сперматозоидов объемом 2 - 5 мкл добавляется к среде с ооцитами, чтобы достичь концентрации сперматозоидов в каплях 1,0 - 1,5 млн./мл. Через 44 - 48 часов после осеменения определяют наличие дробления ооцитов. Затем эмбрионы помещают в монослой эпителиальных клеток для дальнейшего развития в течение 5 дней.

Межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных. Пересадка эмбрионов, например, овец козам и наоборот сопровождается их приживляемостью, но не завершается рождением потомства. Во всех случаях межвидовых беременностей непосредственной причиной абортов является нарушение функции плаценты за счет иммунологической реакции материнского организма на инородные антигены плода. Эта

несовместимость может быть преодолена получением химерных эмбрионов с помощью микрохирургии.

9.3. Клонирование животных

Ядро соматической клетки обладает полной генетической информацией о данном организме. Если создать условия для реализации этой информации, то можно получить неограниченное число генетических копий (клонов) определенной особи.

Получение однояйцовых близнецов – имеет большое значение для животноводства. При этом увеличивается выход телят от одного донора, появляются генетически идентичные двойни. Для этого эмбрионы млекопитающих на ранних стадиях развития разделяют микрохирургическим путем на две или более частей. Они в последующем развиваются в отдельный организм. Разделенные эмбрионы коров могут храниться в замороженном состоянии.

Клонирование эмбрионов путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные (лишенные ядра) яйцеклетки. Включает следующие этапы: выделение интактного ядра донора; энуклеация ооцита; пересадка ядра в энуклеированную яйцеклетку; активация ооцита и слияние мембран яйца и ооцита под действием электрического импульса.

Данная технология позволяет получить из отдельной эмбриональной клетки множественные копии генетически одинаковых животных (до 64). Повторное клонирование полученных этим методом эмбрионов повышает потенциальные возможности технологии в производстве большого числа клонов.

Клонирование животных путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки – метод позволяет получить не только одинаковых между собой животных, но и идентичных по генотипу с животными-донорами соматических клеток. Эта технология может быть использована для сохранения исчезающих пород животных.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Значение трансплантации эмбрионов для животноводства.
- 2) Перечислите основные этапы технологии трансплантации эмбрионов.
- 3) Требования, предъявляемые к коровам-донорам и коровам-реципиентам.
- 4) Техника вызывания суперовуляции и искусственное осеменение коров-доноров.
- 5) Способы извлечения эмбрионов.
- 6) Оценка эмбрионов.
- 7) Способы пересадки эмбрионов реципиентам.
- 8) Консервация эмбрионов.
- 9) Технология оплодотворения яйцеклеток млекопитающих *in vitro*.
- 10) Межвидовые пересадки эмбрионов.
- 11) Методы клонирования животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М: Мир, 2002. – 589 с.
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
5. **Марченко, Г.Г.** Гибридизация животных / Г.Г. Марченко, О.И. Бирюков, Т.С. Преображенская. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2008. – 84 с.
6. **Никульников, В.С.** Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретинин. – М.: Колос, 2007. – 544 с. – ISBN 978-5-10-003966-2
7. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
8. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

Дополнительная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
3. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
4. Он-лайн-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

Лекция 10

ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ

10.1. Методы получения трансгенных животных

Трансгенными называют животных с измененной наследственностью, которая вызвана включением в их геном чужеродных генов с помощью следующих генно-инженерных методов:

Микроинъекции гена. Предварительно у животных гормональной обработкой вызывают суперовуляцию и проводят оплодотворение. Затем извлекают эмбрионы на стадии пронуклеуса хирургическим путем или после убоя доноров.

Для микроинъекции эмбрионов необходим стабильный рабочий стол, на который устанавливают микроскоп, два микроманипулятора для управления удерживающей и инъекционной пипетками и прибор для регулирования инъекционного давления. На столике микроскопа устанавливают инъекционную камеру со средой, покрытой парафиновым маслом. В среду помещают эмбрионы. Для инъекции эмбрионы по мере необходимости посредством пониженного давления фиксируют на удерживающей пипетке так, чтобы инъецируемый пронуклеус был хорошо виден. Кончик инъекционной пипетки (внутренний диаметр около 1 мкм) наполняют раствором ДНК. О точности операции судят по набуханию пронуклеуса. После инъекции эмбрионы освобождаются от удерживающей пипетки и культивируют до момента пересадки реципиентам.

Так, в оплодотворенных яйцеклетках мыши или кролика пронуклеусы хорошо видны, их легко инъецировать. У эмбрионов сельскохозяйственных животных в цитоплазме имеются темные липидсодержащие гранулы. Они затрудняют визуализацию пронуклеусов. Поэтому предварительно проводят центрифугирование. При этом гранулы смещаются к одному полюсу яйцеклетки и пронуклеусы становятся видимыми и доступными для микроинъекций.

Затем эмбрионы культивирования *in vitro* (до нескольких часов) и хирургически трансплантируют в яйцевод синхронизированных реципиентов.

Для образования трансгенных линий животных значение имеет получение таких трансгенных животных, у которых часть половых клеток содержат трансген. Возможно появление мозаик – животных, состоящих из двух или нескольких клеточных линий, происходящих от одной зиготы, но имеющих различные генотипы. Часть мозаиков не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Чтобы получить одно трансгенное животное, трансген которого был бы включен в геном животного, и оно было способно дать трансгенное потомство, необходимо не менее 100 беременностей после пересадки микроинъецированных эмбрионов.

Эффективность микроинъекций у крупных домашних животных очень низкая.

Пересадка трансфицированных ядер. При этом используются ядра клеток, отобранные на основе трансгенной интеграции, то есть пересаживаются только трансгенные эмбрионы. Поэтому любой новорожденный организм будет трансгенным. Последующая селекция трансгенных эмбрионов не требуется.

Использование сперматозоидов в качестве векторов экзогенного ДНК. При этом

сперматозоиды могут быть взяты от одного самца и пересажены в семенники самца того же или другого вида. Там они становятся функционирующими.

10.2. Выведение трансгенных животных с улучшенными признаками

Трансгенные животные с новыми хозяйственно-полезными свойствами. Одним из основных направлений генной инженерии на первом этапе было изменение наследственности животных в отношении увеличения скорости роста, повышения надоев и улучшение качества продукции.

Рост животного – сложным процессом, который зависит от действия генов, условий питания и факторов окружающей среды. С генетической точки зрения интересны гены, которые кодируют протеины каскада гормона роста.

Еще в 40-е годы XX века было установлено стимулирующее действие гипофизарного гормона роста на молочную продуктивность коров. Однако из-за высокой стоимости данный препарат не нашел практического применения.

К концу 70-х годов XX века было показано, что гормон роста микробного происхождения оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный гормон роста.

При применении рекомбинантного гормона роста (13 мг в день) удои увеличиваются на 23 - 31 %. Разработаны формы препарата пролонгированного действия. При этом обработку проводят один раз в две недели или в месяц.

Ежедневные инъекции гормона роста молодняку крупного рогатого скота, свиней, овец увеличивают суточные привесы на 20 - 30 %. Кроме того, это сопровождается сокращением расхода кормов на единицу прироста. Все исследователи отмечают увеличение содержания белка и уменьшение содержания жира в тканях трансгенных животных с генами гормона роста. Это повышает качество и товарную ценность получаемых мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши с геном гормона роста были получены в 1982 году.

Рассматривается, например, возможность уменьшения содержания лактозы в молоке путем создания трансгенных овец или крупного рогатого скота, которые несут специфический для молочной железы промотор, сцепленный с геном лактозы. При этом становится возможным расщепление лактозы (молочного сахара) на глюкозу и галактозу уже в молоке коров. Молоко таких животных может использоваться людьми, у которых отсутствует фермент лактазы.

Обсуждается также возможность введения генов, вырабатывающих определенные антитела, которые предотвращают маститы.

Трансгенные животные с устойчивостью к заболеваниям. Попытки вести селекцию на устойчивость к разным заболеваниям не дали радикальных результатов. Но известны отдельные положительные примеры.

Так, созданы популяции крупного рогатого скота с примесью крови зебу, которые устойчивы к ряду кровепаразитарных заболеваний.

Вторжению или размножению возбудителей препятствуют иммунные механизмы и экспрессия генов комплекса гистосовместимости, а также иммунологическая способность различных молекул (интерферон, нейропептиды, гормоны и интерлейкины).

В Голландии исследуется возможность получения трансгенных животных, способных повысить содержание лактоферина в тканях молочной железы с целью повышения резистентности к маститу.

Применение техники трансгеноза для улучшения состава молока. Большинство из наиболее важных изменений в составе молока были инициированы фармацевтической промышленностью. Эффективность молочной железы в качестве биореактора настолько высока, что стоимость продукции может быть многократно снижена, даже если процесс очистки еще недостаточно эффективный.

Ценные изменения в составе молока могут быть достигнуты количественно (путем изменения соотношения компонентов молока) или качественно (путем добавления других компонентов, которые не присутствуют в составе натурального молока, но усилят его питательную ценность).

Так, у трансгенных кроликов был получен с молоком кальцитонин – пептид, ответственный за регуляцию обмена кальция и используемый при остеопорозе.

С экономической точки зрения большой интерес представляет увеличение содержания казеина в молоке, так он влияет на производство сыра. Один из возможных путей увеличения уровня казеинов – торможение производства других белков. Для этой роли подходит β -лактоглобулин. Этот белок присутствует только в молоке жвачных и является основным аллергеном молока коров. Поэтому уменьшение его количества могло бы улучшить состав молока.

Лактоза – основной сахар в молоке, ответственна за нарушение пищеварения, когда уменьшается уровень фермента лактазы, который гидролизует лактозу на моносахариды. Для уменьшения концентрации лактозы в молоке разработано несколько подходов. Так, были получены α -лактальбумин-дефицитные мыши, так как этот белок является одним из компонентов для синтеза лактозы. Другой подход: вызывание гидролиза лактозы *in vivo*. При этом лактоза гидролизруется путем экспрессии лактозы в тканях молочной железы.

Молоко может быть использовано в качестве транспортного средства для других веществ, которые усиливают его питательные и функциональные свойства. Например, лактоферрин – кислый белок человеческого молока с бактериостатическими свойствами, который усиливает адсорбцию железа. Он присутствует в молоке коров на очень низком уровне. Например, получены трансгенные мыши, которые экспрессируют человеческий лактоферрин. Показано, что этот лактоферрин увеличивает адсорбцию железа и защищает сохранность потомства, так как ограничивает наличие свободного железа в межклеточном пространстве желудочно-кишечного тракта и контролирует тем самым размножение бактерий.

Например, лизоцим оказывает антибактериальное влияние и вследствие его связи с казеинами способствует увеличению выхода сыра. Возможно, он также вызывает специфический иммунитет у новорожденных с секрецией специфических антител. Высокие титры нейтрализующих антител были получены в молоке трансгенных животных.

Трансгенные животные, продуцирующие биологически активные вещества медицинского и технологического назначения. Основа стратегии использования трансгенных животных как биореакторов состоит во включении в клетки организма генов, которые вызывают у них синтез новых белков.

Так, созданы трансгенные клеточные линии млекопитающих, которые выращиваются в системах биореакторов и способны производить белки, закодированные экзогенными (чужеродными) генами. Эти системы были успешно использованы в получении ценных продуктов фармакологического и медицинского назначения (инсулин, некоторые кровесвертывающие факторы, человеческий гормон роста).

Создание клеточных культур – сложная и дорогая процедура. Получаемые новые

белки в линиях генно-инженерных клеток млекопитающих в некоторых случаях правильно модифицированы, имеют активность на уровне нативных протеинов, но выход белка из этих клеток низкий.

Промышленные реакторы, в которых выращиваются клетки также являются дорогими. Трансгенных животных трудно создавать и дорого. Однако однажды созданная линия таких животных легко воспроизводит себе подобных. Они легко размножаются, их содержание сравнительно дешево, они могут продуцировать большое количество белков низкой стоимости.

Гетерогенные белки могут быть получены большинством тканей (человека) животного. Начаты работы по получению трансгенных животных-доноров органов и тканей по пересадке человеку.

10.3. Биотехнология и биобезопасность

Биотехнология изменяет фундаментальные свойства организмов: наследственность, изменчивость, энерго- и массообмен, адаптацию и устойчивость, продуктивность и качество. Такое искусственное вмешательство в генетические структуры не позволяет всегда точно прогнозировать возможные последствия. Это вызывает большое беспокойство людей, что может затормозить развитие биотехнологии и особенно биоинженерии.

Биобезопасность – это защищенность человека и окружающей среды от вредного воздействия различных биологических соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах. Биобезопасность важна не только для человека, но и для растений, животных и полезных микроорганизмов.

Манипуляции с растительными и животными клетками и их органеллами основаны на фундаментальных свойствах клеток и тканей, тотипотентности, соматической гибридизации, дифференциации и дедифференциации. В клеточных технологиях постоянно используется спонтанный и направленный мутагенез. Это приводит к генетической гетерогенности клеток. Исходя из этого, в клеточных биотехнологиях должен быть построенный мониторинг полученных мутантов. Они должны иметь устойчивые генотипы, так как распространение неустойчивых мутантов может привести, например, в сельском хозяйстве к большим потерям урожая.

Биотехнологические процессы нужно непрерывно контролировать и своевременно выявлять возможные отклонения от нормы основных параметров и качества продукции. Показано, что при работе с животными тканями и клетками возможно накопление токсических веществ, необычных продуктов метаболизма. Считают, что клеточная биотехнология растений (селекция сортов, получение продуктов для фармацевтической и пищевой промышленности) более безопасна, чем использование клеточных и тканевых технологий в животноводстве.

При проведении рДНК-биотехнологии важной проблемой является возможность получения мутантов с содержанием токсичных или аллергенных для человека белков или других опасных соединений. Не исключено, что при трансгенозе могут активироваться «молчащие» гены, поэтому вероятно появление генотипов, опасных для здоровья и жизни человека. Возможность появления таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных, синтетических генов для трансгенных растений, животных и микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами. Не исключено также взаимодействие полученных модифицированных

генов с генами третьих генотипов, что может привести к становлению новых генотипов с опасными свойствами для людей и окружающей среды.

Однако 30 лет интенсивных работ в области новейшей биотехнологии – генетической инженерии – показывают их безопасность. Это объясняется исходя из следующих основных положений:

- В биоинженерных работах используются природные гены, которые за все время эволюции подвергались отбору, элиминации, рекомбинации и т.д. В результате этого выработались механизмы, которые обеспечивают устойчивый характер репарации биосинтеза белков и их качества.
- В биоинженерных лабораториях постоянно проводится мониторинг за качеством получаемых трансгенных организмов. Это позволяет заблаговременно, на этапе создания генетически-модифицированных объектов (ГМО) в лаборатории, выявить опасные генотипы и не допускать их в производство.
- Для создания ГМО используются проверенные гены и их регуляторные генетические структуры, что позволяет получать трансгенные организмы с заданными свойствами.

Тем не менее, генно-инженерные исследования по трансгеннозу должны оставаться под строжайшим контролем ученых и государства. Для оценки биобезопасности ГМО и полученных из них пищевых и других продуктов необходима санитарно-гигиеническая экспертиза, которую проводит институт питания РАМН. В институте проверяют химический состав исходных и трансгенных растений; биологическую ценность и усвояемость приготовленных из ГМО продуктов; оценивается возможность ГМО и полученных из них продуктов вызывать аллергию или влиять на иммунную систему человека; токсическое, канцерогенное и мутагенное действие ГМО; изменение репродуктивных функций животных под влиянием ГМО и полученных из них продуктов.

Испытание генетически измененных растений на биобезопасность проводят также в институтах фитопатологии и биологической защиты растений РАСХН, центре биоинженерии РАН. Они изучают участки ДНК, встроенные в геном растений, проверяют возможность транслокации измененного гена в другие организмы, оценивается влияние нового гена на поражаемость растений болезнями и повреждаемость вредителями, на почвенную микрофлору и др. В 2000 г. разработаны и утверждены методические указания «Медико-биологическая оценка пищевой продукции из генетически модифицированных источников». В них установлен порядок гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников. Утверждены методики медико-гигиенической, медико-биологической оценки и клинических испытаний всех видов пищевой продукции, полученной с помощью ГМО. Эти указания должны выполняться и строго контролироваться.

В настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. Так, в России Федеральный Закон № 86 «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят 5 июня 1996 г. В этом законе установлены четыре уровня риска возможного потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека:

1. уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность для здоровья и сопоставимы с риском при работе с непатогенными микроорганизмами;

2. уровень соответствует работам, которые представляют незначительную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с условно-патогенными микроорганизмами;

3. риск работ, которые представляют умеренную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции;

4. уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность при работах с возбудителями особо опасных инфекций.

В законе определены требования к лицам, осуществляющим генно-инженерную деятельность; требования по стандартизации и сертификации генно-инженерной продукции (услуг). Закон определяет ответственность юридических и физических лиц, осуществляющих генно-инженерную деятельность и пр. С 2001г. в России установлена система обязательной маркировки пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников. Это обеспечивает условия выбора гражданами продовольственной и другой продукции с учетом ее генетической природы и личного отношения каждого к такой продукции.

Для производства и реализации всех товаров, в т.ч. полученным из ГМО, обязательным является их стандартизация. Госстандарт России предложил создать федеральную программу «Проблемы производства и реализации продуктов питания, полученных из генно-модифицированных источников пищи». Главная задача этой программы – нормативное и нормативно-методическое обеспечение качества и генетической безопасности генно-инженерно модифицированных продуктов питания и продовольственного сырья. Приоритетным направлением в области нормативного обеспечения является разработка «Концепции стандартизации генно-модифицированных продуктов»; внесение изменений в действующую нормативную документацию на пищевую продукцию, продовольственное сырье и методы испытания, в частности включение дополнительных требований по генетической чистоте, идентификации и маркировке генно-модифицированных продуктов питания; на пороговые уровни потребления для человека ГМ-продуктов питания. Необходимо разработать правила и порядок оценки соответствия ГМ-продуктов питания требованиям генетической безопасности; нормативные документы по государственному контролю и надзору за производством, хранением, реализацией и обращением ГМ-продуктов питания.

В США масштабы и достижения биоинженерных работ значительно превышают российские. Это объясняется устойчивой финансовой поддержкой таких работ, а также более мягкими требованиями к производству ГМО. В результате половина посевов сои и четвертая часть посевов кукурузы в фермерских хозяйствах заняты трансгенными сортами и гибридами. США занимают первое место в мире по объемам производства ГМ-продуктов. Главное направление в биоинженерии этой страны – создание ГМ сортов и гибридов сои, кукурузы, хлопчатника, сахарной свеклы, картофеля, томатов, риса и др., устойчивых к тотальному гербициду раундапу (глифосату), грибным болезням и насекомым. В этой стране нет никаких проблем с выращиванием и реализацией семян ГМ сортов и гибридов, что обеспечивает существенную прибавку к прибыли, сокращая затраты на гербициды и пестициды и уход за посевами. Обязательного маркирования продовольственных товаров, полученных из генетически модифицированных сортов и гибридов, в США пока не введено, но их можно ввести по желанию покупателей на любом торговом предприятии в любое время.

Итак, научно-обоснованные проверенные факты против создания и использования ГМО и полученных из них продуктов пока отсутствуют. Между тем только с помощью биотехнологии и биоинженерии можно будет прокормить 10 или 11 млрд. населения Земли.

Важнейшими задачами в области биотехнологии для России являются: **а)** создание и реализация, утвержденной федеральным законом научной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; **б)** признание важнейшим приоритетом XXI в. ядерной биологии, стратегической части биотехнологии; **в)** приоритетное финансовое обеспечение развития биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; **г)** оснащение биоинженерных научных учреждений современным научным оборудованием; **д)** привлечение для выполнения этой программы молодых исследователей; **е)** объективное информирование населения страны о содержании и результатах исследований по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; **ж)** совершенствование законодательной и другой нормативно-правовой базы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности и др.

Россия пока отстает от многих стран в области биотехнологии и биоинженерии. В нашей стране до сих пор не зарегистрировано ни одного генно-инженерно-модифицированного сорта гибрида сельскохозяйственных культур отечественного производства. Решение этой важной проблемы возможно на путях быстрого развития сельского хозяйства и выведения его из глубокого экономического кризиса, создание и выполнение всех нормативных документов по биотехнологии и биоинженерии, развитие международного сотрудничества по выполнению совместных проектов по биотехнологии и биоинженерии.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Каких животных называют трансгенными?
- 2) Методы получения трансгенных животных.
- 3) Какие новые хозяйственно-полезные свойства удалось получить при изменении наследственности животных?
- 4) Применение техники трансгеноза для улучшения состава молока.
- 5) Создание трансгенных животных с устойчивостью к заболеваниям.
- 6) Использование трансгенных животных как продуцентов БАВ.
- 7) Понятие «биобезопасность».
- 8) Биобезопасность генноинженерных исследований.
- 9) Нормативно-правовая база биотехнологии и биоинженерии.
- 10) Основные задачи в области биотехнологии для России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
3. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
4. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4

5. **Марченко, Г.Г.** Гибридизация животных / Г.Г. Марченко, О.И. Бирюков, Т.С. Преображенская. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2008. – 84 с.
6. **Никульников, В.С.** Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретинин. – М.: Колос, 2007. – 544 с. – ISBN 978-5-10-003966-2
7. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
8. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

Дополнительная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
3. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
4. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Костенко Т.А., Костенко В.К.; под ред. П.А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-7493-1236-2
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. **Блинов, В.А.** Биотехнология пивной дробины (консервирование и биотрансформация) / В.А. Блинов, И.А. Сазонова, Е.Н. Зеленцова. – Саратов: «Контур-Про», 2006. – 65 с.
5. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях. Ч. 2. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – 144 с. – ISBN 5-7011-0436-2
6. **Блинов, В.А.** Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / В.А. Блинов, С.В. Ковалева, С.Н. Буршина. – Саратов: ИЦ «Наука», 2011. – 171 с. – ISBN 978-5-9999-0927-5
7. **Блинов, В.А.** ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.
8. Генетически модифицированные растения и продукты питания: реальность и безопасность. Аналитический обзор [Электронный ресурс]. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 200 с. – ISBN: 5-7367-0543-5 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
9. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М: Мир, 2002. – 589 с.
10. **Елинов, Н.П.** Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – ISBN 5-02-026027-4
11. **Клунова, С.М.** Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-6697-4
12. **Марченко, Г.Г.** Гибридизация животных / Г.Г. Марченко, О.И. Бирюков, Т.С. Преображенская. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2008. – 84 с.
13. **Мотовилов, К.Я.** Экспертиза кормов и кормовых добавок: учебно-справочное пособие / К.Я. Мотовилов, А.П. Булато, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 336 с.
14. **Никульников, В.С.** Биотехнология в животноводстве: учебное пособие / В.С. Никульников, В.К. Кретинин. – М.: Колос, 2007. – 544 с. – ISBN 978-5-10-003966-2
15. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
16. **Ситников, В.В.** Использование микроорганизмов-пробионтов в выращивании птицы: монография / В.В. Ситников. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2010. – 106 с. – ISBN 978-5-7011-0586-5
17. Современная биотехнология в ветеринарной медицине / Шишков В.Н. и др. – М., 1988. – 56 с.
18. **Тарантул, В.З.** Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 – Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
19. **Фаритов, Т.А.** Корма и кормовые добавки для животных: учебное пособие / Т.А. Фаритов. – СПб.: Лань, 2010. – 304 с. – ISBN 978-5-8114-1026-2
20. **Фисинин, В.И.** Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник / В.И. Фисинин, И.А. Егоров, И.Ф. Драганов. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 344 с. – ISBN 978-5-9704-1996-0
21. **Цыганский, Р.А.** Физиология и патология животной клетки: учебное пособие / Р.А. Цыганский. – СПб.: Лань, 2009. – 336 с. – ISBN 978-5-8114-0870-2
22. Журналы: Ветеринария и кормление, Главный зоотехник, Животноводство России, Зоо-

техния, Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство, Кормопроизводство, Птицеводство, Свиноводство.

23. Адаптивное кормопроизводство: Международный научно-практический электронный журнал ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса; ссылка доступа – http://adaptagro.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=73&lang=ru

24. Ветеринарная энциклопедия: ветеринарные препараты (ссылка доступа – <http://www.webvet.ru>)

25. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)

26. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)

27. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Лекция 1. Введение в дисциплину. Биотехнологические основы почвоведения.....	4
1.1. Значение биотехнологии для растениеводства и животноводства.....	4
1.2. Почвенная биотехнология: краткая история развития.....	4
1.3. Физико-химическая характеристика почвы.....	5
1.4. Микрофлора почвы.....	6
1.5. Механизм действия почвенных микроорганизмов.....	7
Вопросы для самоконтроля.....	8
Список литературы.....	9
Лекция 2. Биологические способы повышения урожайности сельскохозяйственных растений.....	10
2.1. Общие сведения об удобрениях.....	10
2.2. Виды бактериальных удобрений.....	10
2.3. Гормоны растений (фитогормоны)	12
2.4. Фиторегуляторы.....	14
Вопросы для самоконтроля.....	14
Список литературы.....	14
Лекция 3. Биотехнологические методы защиты растений.....	16
3.1. Химические способы защиты растений.....	16
3.2. Биологические способы защиты растений.....	17
3.3. Фиторегуляторы в системе защиты растений.....	19
Вопросы для самоконтроля.....	19
Список литературы.....	20
Лекция 4. Биотехнология растений.....	21
4.1. Вегетативное размножение растений методом культур тканей.....	21
4.2. Поверхностное культивирование клеток растений.....	22
4.3. Культивирование клеток растений в глубинных условиях.....	22
4.4. Иммобилизация растительных клеток.....	23
4.5. Сохранение культур клеток растений.....	23
4.6. Использование методов генетической инженерии в фитобиотехнологии.....	24
Вопросы для самоконтроля.....	25
Список литературы.....	26
Лекция 5. Биотехнологические способы заготовки растительных кормов.....	27
5.1. Принцип силосования кормов.....	27
5.2. Микрофлора силоса.....	28
5.3. Химическое силосование сочных кормов.....	30
5.4. Ферментные препараты и бактериальные закваски для силосования кормов	30
5.5. Теоретические основы сенажирования трав.....	30
5.6. Протеинизация крахмалсодержащего сырья.....	32
5.7. Модификация сока зеленых растений.....	32
Вопросы для самоконтроля.....	33
Список литературы.....	34
Лекция 6. Технология производства кормового белка.....	36
6.1. Нетрадиционные источники кормового белка.....	36
6.2. Сырьевая база для синтеза комового белка.....	37

6.3. Принципиальная технологическая схема выращивания кормовой биомассы	38
Вопросы для самоконтроля.....	40
Список литературы.....	40
Лекция 7. Кормовые добавки биотехнологического генеза.....	42
7.1. Кормовые препараты аминокислот.....	42
7.2. Ферментные препараты.....	43
7.3. Витамины.....	44
7.4. Пробиотики.....	45
7.5. Использование отходов технических производств в кормлении животных..	48
Вопросы для самоконтроля.....	50
Список литературы.....	50
Лекция 8. Технология культивирования клеток животных.....	52
8.1. История применения культур клеток животных.....	52
8.2. Основные характеристики клеток животных.....	52
8.3. Этапы культивирования клеток животных.....	52
8.4. Способы выращивания клеток животных.....	55
8.5. Питательные среды для выращивания клеток животных.....	56
Вопросы для самоконтроля.....	58
Список литературы.....	58
Лекция 9. Трансплантация эмбрионов.....	59
9.1. Этапы технологии трансплантации эмбрионов.....	59
9.2. Оплодотворение яйцеклеток вне организма животного.....	62
9.3. Клонирование животных.....	63
Вопросы для самоконтроля.....	63
Список литературы.....	64
Лекция 10. Трансгенные животные.....	65
10.1. Методы получения трансгенных животных.....	65
10.2. Выведение трансгенных животных с улучшенными признаками.....	66
10.3. Биотехнология и биобезопасность.....	68
Вопросы для самоконтроля.....	71
Список литературы.....	71
Библиографический список.....	73
Содержание.....	75