

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Саратовский государственный аграрный университет  
имени Н.И. Вавилова»

# **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ**

краткий курс лекций

для бакалавров IV курса

Направление подготовки  
**240700.62 Биотехнология**

Профиль подготовки  
**Биотехнология**

Саратов 2016

УДК 575  
ББК 30  
П58

Рецензенты:

Заведующая кафедрой «Экология», доктор биологических наук,  
профессор ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет  
имени Гагаина Ю.А.» *Е.И. Тихомирова*

Профессор кафедры «Микробиология, вирусология и биотехнология»,  
доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»  
*А.А. Щербаков*

П58

**Биологическая безопасность биотехнологических производств:** краткий курс лекций для студентов IV курса направления подготовки 240700.62 «Биотехнология» / Сост.: Ю.А. Попов, Т.С. Осина // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2016. – 60 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Биологическая безопасность биотехнологических производств» составлен в соответствие с рабочей программой дисциплины и предназначен для студентов направления подготовки 240700.62 «Биотехнология». Краткий курс лекций содержит теоретический материал об основных факторах биологической опасности биотехнологических производств; рассмотрены основы молекулярной генетики и система безопасности в области генно-инженерной деятельности; проблемы биобезопасности при работе с промышленными штаммами; экологические аспекты биотехнологических производств. Курс лекций направлен на формирование у студентов знаний об источниках биологической угрозы в области биотехнологий и правил биологической безопасности при проведении научных микробиологических и биотехнологических исследований, а также производственной деятельности, связанной с использованием промышленных штаммов микроорганизмов.

УДК 575  
ББК 30

© Попов Ю.А., Осина Т.С., 2016  
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2016

## Введение

Современная биотехнология имеет потенциальные возможности для обеспечения основных потребностей страны в широком спектре биотехнологических препаратов медицинского и ветеринарного назначения, в пищевых продуктах, в средствах защиты растений и биоудобрениях, в биопрепаратах для проведения природоохранных мероприятий, для добычи минерального сырья, для получения новых материалов, в создании возобновляемых источников энергии и создании электронных приборов различного назначения. Одновременно надо понимать, что биотехнологическое производство может представлять опасность для человека и экосистем, так как даже непреднамеренно в хозяйственный оборот и окружающую среду может быть выпущен опасный экопатоген с трудно прогнозируемыми последствиями.

Тем не менее, абсолютной безопасности в биотехнологии, как, впрочем, и в других отраслях деятельности человека, достичь невозможно. Утечка опасного биологического материала из научно-исследовательского учреждения при аварии и его использование в биопреступлении может привести к возникновению биолого-социальной чрезвычайной ситуации.

Краткий курс лекций содержит теоретический материал об основных факторах биологической опасности биотехнологических производств; рассмотрены основы молекулярной генетики и система безопасности в области генно-инженерной деятельности; проблемы биобезопасности при работе с промышленными штаммами; экологические аспекты биотехнологических производств.

Курс лекций направлен на формирование у студентов знаний об источниках биологической угрозы в области биотехнологий и правил биологической безопасности при проведении научных микробиологических и биотехнологических исследований, а также производственной деятельности, связанной с использованием промышленных штаммов микроорганизмов.

## ВВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМУ

### 1.1. Термины и понятия биобезопасности

Вопросы биологической опасности/безопасности актуальны для многих областей народного хозяйства:

- безопасность лекарственных средств (химическое и биологическое загрязнения, фальсификация);
- безопасность пищевых продуктов (ПБА, ГМО);
- безопасность микробиологических лабораторий и производств;
- экологическая безопасность (изменение биологического разнообразия, нарушение экологического равновесия, появление новых резервуаров инфекций);
- эпидемическая безопасность;
- военная безопасность;
- противодействие биологическому терроризму.

В современном определении термина «биобезопасность» нашло отражение понимание того, что защищенность может только приближаться к абсолютной (100%-ной).

*Задачи биобезопасности:* защита населения и окружающей среды; защита персонала; качество (защита) продукции.

*Оценка рисков* – основа практики биобезопасности. Поэтому *биобезопасность* – это степень защищенности объекта от влияния биориска.

*Основные составляющие оценки рисков:*

- специфические характеристики организмов, на которых предполагается проводить эксперименты;
- специфические характеристики подопытных животных, которые могут быть использованы;
- применяемое оборудование и процедуры;
- изолирующее оборудование и средства.

*Этапы обеспечения биобезопасности на основе учета биорисков:* выявление биорисков; оценка биорисков; управление биорисками.

### 1.2. Нормативная база для обеспечения биобезопасности биотехнологических производств

В России основой нормативной базы для работы с патогенными микроорганизмами основой являются периодически обновляемые Санитарные правила работы с возбудителями заболеваний IV - I групп патогенности СП 1.3.2322-08 / СП 1.3.2518-09.

Для работы с непатогенными штаммами промышленного назначения дополнительно введена оценка микроорганизмов по уровню допустимой концентрации клеток в рабочей зоне (ПДК) со ссылкой на ГОСТ 12.1.007-76, предусматривающий классификацию вредных веществ на 4 класса опасности, распространяющийся на вредные вещества, содержащиеся в сырье и продуктах.

При использовании в биотехнологии штаммов микроорганизмов, формально отнесенных к IV-ей или III-ей группам патогенности, предусмотрено выполнение соответствующих мер физической защиты, в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322-08, СП 1.3.2518-09 «Безопасность работы с микроорганизмами

III - IV групп патогенности». Патогенные микроорганизмы, отнесенные ко II-ой и I-ой группам патогенности, работа с которыми регулируется СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности», в промышленности, практически, не используются).

Для обеспечения безопасности при работе с непатогенными штаммами микроорганизмов промышленного назначения дополнительно использован ГОСТ 12.1.007-76, предусматривающий классификацию вредных веществ на 4 класса опасности, распространяющийся на вредные вещества, содержащихся в сырье и продуктах и предусматривающий 4 уровня (в соответствии с классом опасности) максимально допустимой концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Хотя этот ГОСТ исходно не распространялся на микроорганизмы, учитывая необходимость нормативного регулирования мер для обеспечения биобезопасности в биотехнологии, подобные классы опасности (3-ий, 4-ый и соответствующие этим классам предельно допустимые уровни концентрации клеток микроорганизмов в рабочей зоне) были введены и для непатогенных промышленных микроорганизмов в гигиенических нормативах. При этом непатогенность, ПДК и аллергенность для каждого штамма микроорганизмов определялись экспериментально на лабораторных животных.

По существующим российским нормативам ряд штаммов микроорганизмов, получивших за рубежом статус GRAS (признанные безопасными для использования), находятся под действием СП 1.3.2322-08 / СП 1.3.2518-09, и возможности выведения их из-под действия этих правил нет, несмотря на длительную историю безопасного применения, отсутствия у них патогенности по данным комиссионной проверки в сертифицированных учреждениях РФ. Так, к категории GRASS за рубежом относятся широко используемые промышленные штаммы родов *Aspergillus* и *Rhizopus*. Штаммы нескольких видов этих мицелиальных грибов столетиями широко используются в пищевой промышленности для получения ферментированных пищевых продуктов. В то же время, в редакции Санитарных правил СП 1.3.2322-08 все штаммы родов *Aspergillus* и *Rhizopus* формально отнесены к патогенам IV группы (за исключением некоторых видов, отнесенных в III группе патогенности).

*Нормативная база и информационные ресурсы для обеспечения биобезопасности биотехнологических производств:*

1. Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней СП 1.3.2322-08.

2. Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Дополнения и изменения №1 К СП 1.3.2518-09.

3. Государственный стандарт СССР. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности ГОСТ 12.1.007-76

4. Руководство NIH Guidelines

([http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guidelines/NIH\\_Guidelines.htm](http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guidelines/NIH_Guidelines.htm))

5. Руководство «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях» (BMBL). Издание пятое

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf>

6. GRAS статус (признанный безопасным для использования).

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm061846.htm#Q1>

7. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных усло-

виях. Издание третье. Всемирная организация здравоохранения, 2004.

<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>

8. Система управления лабораторными биорисками. Стандарт WA15793:2008

[http://www.cen.eu/cen/Sectors/TechnicalCommitteesWorkshops/Workshops/Documents/WS55\\_DraftCWA.pdf](http://www.cen.eu/cen/Sectors/TechnicalCommitteesWorkshops/Workshops/Documents/WS55_DraftCWA.pdf)

9. Национальный Комитет по Биологическим Агентам (ABAS), [www.baua.de/abas](http://www.baua.de/abas).

10. Приложение III Директива 2000\54 ЕС по защите от рисков, связанных с использованием биологических агентов. Официальный журнал Европейского Сообщества, № L262/21 17.10.2000

<http://osha.europa.eu/en/legislation/directives/exposure-to-biological-agents/77>

11. Федеральная газета Bundesarbeitsblatt, Германия. Издание 06.2000 с дополнениями и поправками 04-2002, 10-2002, 11-2004

12. Конвенция по биоразнообразию. Картахенский протокол

([www.biodiv.org/biosafety/signinglist.aspx?sts=rtf](http://www.biodiv.org/biosafety/signinglist.aspx?sts=rtf)).

13. Гигиенические критерии для обоснования необходимости разработки ПДК и ОБУВ (ОДУ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест, воде водных объектов. Гигиенические нормативы ГН 1.1.701-98.

14. Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны. Гигиенические правила ГН 2.2.6.709-98.

15. Руководство по составлению документа, подтверждающего безопасность биологически опасного объекта. Руководство РЗ.1.3013-12.

16. Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (и изменениями от 12 июля 2000 г., 30 декабря 2008 г., 4 октября 2010 г., 19 июня 2011 г.)

17. Положение «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов», утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 16 февраля 2001 г., № 120.

18. Федеральный закон от 30.03.1999 №52 ФЗ « О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (с изменениями от 30 декабря 2001 г., 10 января, 30 июня 2003 г., 22 августа 2004 г., 9 мая, 31 декабря 2005).

### **1.3. Национальная программа химической и биологической безопасности Российской Федерации**

Постановлением Правительства РФ от 27 октября 2008 г. № 791 утверждена федеральная целевая программа «Национальной системы химической и биологической безопасности РФ (2009 - 2013)».

Целью Программы является последовательное снижение до приемлемого уровня риска воздействия опасных химических и биологических факторов на биосферу, техносферу и экологическую систему.

Основными задачами Программы являются: предупреждение возникновения источников и очагов химического и биологического поражения (заражения) путем систематического мониторинга опасных химических и биологических факторов; совершенствование законодательства Российской Федерации и нормативных документов в области химической и биологической безопасности, а также контроля за их исполнением; уменьшение масштабов потенциальных очагов химического и биологического поражения и суммарных площадей зон защитных мероприятий путем проведения комплекса

мер в отношении источников химической и биологической опасности; повышение защищенности населения и среды его обитания от негативных влияний опасных химических веществ и биологических агентов, снижение уровня их воздействия путем внедрения современных средств защиты, разработанных с учетом мониторинга опасных биологических и химических факторов окружающей среды.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Понятие и задачи биобезопасности.
- 2) Оценка рисков. Основные составляющие оценки рисков.
- 3) Перечислите этапы обеспечения биобезопасности на основе учета биорисков.
- 4) Основные положения Санитарных правил работы с возбудителями заболеваний IV - I групп патогенности СП 1.3.2322-08 / СП 1.3.2518- 09.
- 5) Нормативная база и информационные ресурсы для обеспечения биобезопасности биотехнологических производств.
- 6) Цель и задачи Национальной программы химической и биологической безопасности Российской Федерации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. *Бирюков, В.В.* Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
3. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
4. *Донченко, Л.В.* Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надыква. – М.: Пищепромиздат, 2001. – 528 с.
5. *Закревский, В.В.* Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище : практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору / В.В. Закревский. – СПб. : ИОРД, 2004. – 275 с. – ISBN 5-901065-81-6
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

#### Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. *Бирюков, В.В.* Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
3. *Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
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. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
6. *Сазыкин, Ю.О.* Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
7. Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требова-

ния. Дата введения 1977-01-01 // Межгосударственный стандарт. ГОСТ 12.1.008-76. Группа Т58. Утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 10 марта 1976 года № 578. Переиздание. Сентябрь 1999 г.

8. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.

9. Журнал «Биотехнология».

10. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)

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

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

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



## ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ – БАЗИСА СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

### 2.1. Особенности организации генетического материала у микроорганизмов

Наследственный аппарат бактерий представлен одной хромосомой, которая представляет собой молекулу ДНК, она спирализована и свернута в кольцо. Это кольцо в одной точке прикреплено к цитоплазматической мембране. На бактериальной хромосоме располагаются отдельные гены.

Функциональными единицами генома бактерий, кроме хромосомных генов, являются: IS-последовательности, транспозоны, плазмиды.

*IS-последовательности* – это короткие фрагменты ДНК. Они не несут структурных (кодирующих белок) генов, а содержат только гены, ответственные за транспозицию (способность перемещаться по хромосоме и встраиваться в различные ее участки).

*Транспозоны* – это более крупные молекулы ДНК. Помимо генов, ответственных за транспозицию, они содержат и структурный ген. Транспозоны способны перемещаться по хромосоме. Их положение сказывается на экспрессии генов. Транспозоны могут существовать и вне хромосомы (автономно), но неспособны к автономной репликации.

*Плазмиды* – дополнительный внехромосомный генетический материал. Представляет собой кольцевую, двунитевую молекулу ДНК, гены которой кодируют дополнительные свойства, придавая селективные преимущества клеткам. Плазмиды способны к автономной репликации, т.е. независимо от хромосомы или под слабым ее контролем. За счет автономной репликации плазмиды могут давать явление амплификации: одна и та же плаزمида может находиться в нескольких копиях, тем самым усиливая проявление данного признака.

В зависимости от свойств признаков, которые кодируют плазмиды, различают:

1) R-плазмиды. Обеспечивают лекарственную устойчивость; могут содержать гены, ответственные за синтез ферментов, разрушающих лекарственные вещества, могут менять проницаемость мембран.

2) F-плазмиды. Кодируют пол у бактерий. Мужские клетки (F+) содержат F-плазмиду, женские (F-) – не содержат. Мужские клетки выступают в роли донора генетического материала при конъюгации, а женские – реципиента. Они отличаются поверхностным электрическим зарядом и поэтому притягиваются. От донора переходит сама F-плазмиды, если она находится в автономном состоянии в клетке. F-плазмиды способны интегрировать в хромосому клетки и выходить из интегрированного состояния в автономное. При этом захватываются хромосомные гены, которые клетка может отдавать при конъюгации.

3) Col-плазмиды. Кодируют синтез бактериоцинов. Это бактерицидные вещества, действующие на близкородственные бактерии.

4) Tox-плазмиды. Кодируют выработку экзотоксинов.

5) Плазмиды биодegradации. Кодируют ферменты, с помощью которых бактерии могут утилизировать ксенобиотики.

Потеря клеткой плазмиды не приводит к ее гибели. В одной и той же клетке могут находиться разные плазмиды.

## 2.2. Репликация ДНК

**Репликация** – это матричный процесс, лежащий в основе воспроизведения генетической информации и последующей передачи её следующему поколению клеток в процессе деления (митоза).

Структура молекулы ДНК – двойная спираль, основанная на водородных связях между комплементарными нуклеотидными основаниями – дает возможность точного воспроизводства, репликации молекул на своей же основе.

Матрицей являются обе спирали ДНК, продуктами матричного синтеза – комплементарные им новые спирали.

Репликация в основном происходит в период S-интерфазы, но некоторые участки ДНК (район центромеры, например) имеют более растянутый во времени процесс, вплоть до начала профазы митоза.

Из трех имеющихся гипотез о принципе механизма репликации (Дельбрюк, Стент, 1957) наиболее распространенным в живом мире оказался полуконсервативный механизм репликации. Именно так представляли этот процесс Дж. Уотсон и Ф. Крик (1953 г.)

Суть его в том, что молекула ДНК разделяется продольно с помощью ферментов на две спирали и по мере их отделения происходит присоединение к освобожденным нуклеотидам свободных, имеющихся в кариоплазме нуклеотидов. В результате каждая спираль достраивается снова до двойной, а вместо одной молекулы ДНК получается две, совершенно идентичных. Таким образом, хромосома становится двухроматидной.

Две другие гипотезы принципа репликации: консервативная (исходная молекула ДНК - матрица для образования совершенно новой другой двухцепочечной молекулы) и дисперсионная (распад исходной ДНК на фрагменты, их репликация и последующее соединение) оказались маловероятными и, возможно, встречаются лишь у некоторых вирусов, как исключение.

Полуконсервативный механизм репликации ДНК, доказанный М. Мезельсоном и Ф. Сталем (1957), оказался универсальным для воспроизведения генетического материала и показал справедливость модели структуры ДНК, описанной Дж. Уотсоном и Ф. Криком.

Процесс репликации протекает весьма сходно в клетках про- и эукариот, однако имеются несущественные особенности, из которых можно выделить следующие. У прокариот хромосома представлена одним репликоном, т.е. имеет одну начальную точку, или вилку редупликации. У эукариот хромосомы разделены на отдельные участки – репликоны, т.е. вилок редупликации может быть достаточно много. Скорость репликации у прокариот выше, чем у эукариот. Так, у *E. coli* скорость репликации 1500 - 3 000 п.н./с, а у эукариот в среднем 160 - 300 п.н./с. Одна из причин этого: ДНК прокариот не связана с гистонами, как у эукариот.

**Энзимология репликации.** Механизм репликации ДНК требует участия в нем многих ферментов, так как нужно обеспечить разделение комплементарных цепей ДНК, закрученных одна вокруг другой, а также собрать из свободных нуклеотидов две новые спирали.

В разделении цепей ДНК участвуют ферменты, относящиеся к классу топоизомераз. Один из таких ферментов – топоизомераза II, или гираза, переводит ДНК в состояние отрицательной сверхспирализации. Это необходимо для того, чтобы снять положительные сверхвитки, возникающие при раскручивании двойной спирали. Затем другая топоизомераза – хеликаза – раскручивает эту сверхспираль, происходит "плавление" ДНК или разъединение спиралей. Процессы АТФ-зависимы, т.е. требуют затрат энер-

гии. Особые белки удерживают однонитевые участки ДНК, обеспечивая возможность репликации. Синтез новых цепей может происходить только в направлении 5'-3', поэтому только одна из разъединенных цепей может синтезироваться непрерывно. Это будет цепь 3'...5', и её называют лидирующей.

Другая цепь, 5'...3', называется отстающей и синтезируется только в виде фрагментов из 100-200 нуклеотидов (фрагменты Оказаки).

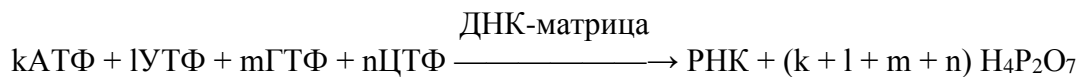
Синтез как на лидирующей цепи, так и на фрагментах Оказаки начнется с синтеза короткого участка РНК (10 - 60 нуклеотидов) при участии РНК-полимеразы-праймазы. Этот участок, называемый РНК-затравкой или праймером, затем удаляется как с 5'-конца модифицирующей цепи, так и с 5'-концов фрагментов Оказаки с помощью фермента ДНК-полимеразы I, действующей как 3'...5' экзонуклеаза. У эукариот эту роль, вероятно, выполняет ДНК-полимераза  $\rho$ .

Основную работу по синтезу новых цепей ДНК выполняет фермент ДНК-полимераза III у прокариот, а у эукариот ДНК-полимераза  $\alpha$ . ДНК-полимераза I (или  $\rho$  – у эукариот), после удаления праймеров заполняет получившиеся однонитевые бреши комплементарными нуклеотидами, а также выполняет корректорские функции: исправляет ошибки, допущенные ДНК-полимеразой III, удаляя неправильно поставленные нуклеотиды и заменяя их нужными.

Еще один класс ферментов – ДНК-лигазы – осуществляют соединение фрагментов Оказаки, формируя целостную систему. У эукариот выделяют также ДНК-полимеразу, которая, видимо, участвует в репликации ДНК.

### 2.3. Процесс транскрипции

Синтез РНК можно представить схемой:



Для синтеза РНК используются трифосфаты рибонуклеозидов. Роль матрицы выполняет одна из цепей ДНК. Транскрипция катализируется ферментом РНК-полимеразой. В результате получается нить РНК, комплементарная ДНК.

В результате транскрипции образуются предшественники тРНК, рРНК и мРНК, которые имеют избыточные участки по концам нуклеотидной цепи. В ядре происходит созревание (процессинг) этих предшественников. При этом избыточные участки отщепляются специфическими ферментами РНКазами.

Созревание мРНК имеет ряд особенностей. Так, в геноме эукариот есть участки ДНК – интроны, которые не несут структурной информации, т.е. ген разбит на ряд кусков. При транскрипции получается РНК с участками, комплементарными интронам. В ходе созревания фрагменты, соответствующие интронам, удаляются, а структурные части соединяются (сплайсинг).

### 2.4. Свойства генетического кода

**Генетический код** – это свойственный всем живым организмам способ кодирования аминокислотной последовательности белков при помощи последовательности нуклеотидов.

В ДНК используется четыре нуклеотида – аденин (А), гуанин (G), цитозин (С), тимин (Т), которые в русскоязычной литературе обозначаются буквами А, Г, Ц и Т. Эти буквы составляют алфавит генетического кода. В РНК используются те же нуклеотиды, за исключением тимина, который заменён похожим нуклеотидом – урацилом, который обозначается буквой U (У – в русскоязычной литературе). В молекулах ДНК и РНК нуклеотиды выстраиваются в цепочки и, таким образом, получают последовательности генетических букв.

Для построения белков в природе используется 20 различных аминокислот. Каждый белок представляет собой цепочку или несколько цепочек аминокислот в строго определённой последовательности. Эта последовательность определяет строение белка, а следовательно все его биологические свойства. Набор аминокислот также универсален для почти всех живых организмов.

Реализация генетической информации в живых клетках (то есть синтез белка, кодируемого геном) осуществляется при помощи двух матричных процессов: транскрипции (то есть синтеза иРНК на матрице ДНК) и трансляции генетического кода в аминокислотную последовательность (синтез полипептидной цепи на матрице иРНК). Для кодирования 20 аминокислот, а также сигнала «стоп», означающего конец белковой последовательности, достаточно трёх последовательных нуклеотидов. Набор из трёх нуклеотидов называется триплетом.

#### ***Свойства генетического кода:***

Триплетность – значащей единицей кода является сочетание трёх нуклеотидов (триплет, или кодон).

Непрерывность – между триплетами нет знаков препинания, то есть информация считывается непрерывно.

Неперекрываемость – один и тот же нуклеотид не может входить одновременно в состав двух или более триплетов. Не соблюдается для некоторых перекрывающихся генов вирусов, митохондрий и бактерий, которые кодируют несколько белков, считываемых со сдвигом рамки.

Однозначность – определённый кодон соответствует только одной аминокислоте. Свойство не является универсальным. Кодон UGA у *Euplotes crassus* кодирует две аминокислоты – цистеин и селеноцистеин.

Вырожденность (избыточность) – одной и той же аминокислоте может соответствовать несколько кодонов.

Универсальность – генетический код работает одинаково в организмах разного уровня сложности – от вирусов до человека (на этом основаны методы генной инженерии).

## **2.5. Биохимические компоненты системы биосинтеза белка. Стадии трансляции**

Для биосинтеза белков нужна белоксинтезирующая система, которая включает: 20 аминокислот, все типы РНК, ионы магния, энергию в виде АТФ и ГТФ, рибосомы, специальные ферменты (аминоацил-тРНК-синтетаза), факторы инициации, элонгации, терминации.

Биосинтез белков отличается от репликации и транскрипции двумя особенностями:

1) нет соответствия между числом нуклеотидов в матрице и числом аминокислот в белке (в мРНК – 4 разных нуклеотида, в белке – 20 разных аминокислот);

2) нуклеотиды и аминокислоты сильно отличаются по строению. Между ними не возможно образование водородных связей типа А·····Т и Г·····Ц, т.е между ними нет комплементарности.

Если репликацию и транскрипцию можно сравнить просто с переписываем текста, то трансляция – это дешифрование, декодирование информации об аминокислотной последовательности, записанной (закодированной) с помощью нуклеотидной последовательности.

Способ шифровки в нуклеиновых кислотах информации о первичной структуре белков получил название биологического кода (его называют также генетическим, нуклеотидным, аминокислотным кодом).

Число нуклеотидных остатков, кодирующих включение в белок одной аминокислоты, называется *кодовым числом*. Экспериментально установлено, что в биологическом коде кодовое число равно трем. Тройку нуклеотидных остатков (триплет), кодирующих включение одной аминокислоты, называют *кодонам*.

Теоретически показано, что код не может состоять из одного нуклеотида, т.к. в этом случае могут кодироваться 4 аминокислоты. При кодовом числе 2 количество разных нуклеотидных пар будет равно числу перестановки из четырех нуклеотидов по 2, т.е.  $4 \cdot 3 = 12$ , а в состав белка входит 20 аминокислот. Для кодирования всех аминокислот белковой молекулы достаточен триплетный код, когда число возможных комбинаций составит  $4^3 = 64$ .

Каждый триплет кодирует только какую-нибудь одну аминокислоту. Это свойство кода называется специфичностью. Одна аминокислота может кодироваться двумя или большим числом (до шести) разных триплетов, т.е. генетический код для аминокислот является вырожденным.

К настоящему времени биологический код изучен у большого количества разных организмов – от вирусов и бактерий до высших животных. Во всех случаях он оказался одинаковым, что свидетельствует о единстве происхождения жизни на Земле.

Из 64 триплетов 61 используется для кодирования аминокислот, а три – УАА, УАГ и УГА – обозначают конец матрицы, т.е. на них обрывается наращивание пептидной цепи. Это терминирующие триплеты.

*В процессе образования пептидной цепи выделяют три стадии:*

1) Инициация (начало)

Синтез белка начинается с образования иницирующего комплекса. мРНК после созревания в ядре выходит в цитоплазму и связывается с малой (40S) субъединицей рибосомы и метиониновой тРНК (Мет-тРНК<sub>Мет</sub>). Затем к этому комплексу присоединяется большая (60S) субъединица рибосом и 8 вне ribосомных белков – факторов инициации. Мет-тРНК<sub>Мет</sub> взаимодействует своим антикодоном с кодонами АУГ или ГУГ на мРНК. Это иницирующие кодоны, с них начинается синтез любого белка.

2) Элонгация (удлинение)

В этой стадии выделяют три этапа: к иницирующему комплексу присоединяется вторая тРНК, несущая аминокислоту. В этой реакции участвует вне ribосомный белок – фактор элонгации EF1; образование пептидной связи; транслокация – перемещение рибосомы относительно мРНК. При этом присоединяются белки элонгации, освобождается Мет-тРНК<sub>Мет</sub> и рибосома сдвигается. Образуется дипептид. После этого присоединяется следующая тРНК с аминокислотой.

Пептид из 100 аминокислот синтезируется примерно за 2 минуты.

3) Терминация (окончание)

Удлинение пептидной цепи продолжается до тех пор, пока на пути рибосомы не встретится один из терминирующих триплетов РНК – УАА, УАГ или УГА. В области этих триплетов при участии вне ribосомных белков – факторов терминации – происходит гидролитическое расщепление связи между пептидом и последней тРНК, и освобождается готовый белок.

На включение в белок каждой аминокислоты расходуется 1 молекула АТФ и 3 молекулы ГТФ.

После того, как белок сошел с мРНК, происходит его созревание или *посттрансляционная достройка*:

1) Протеолиз – отщепление пептидов с N- или C-конца. Например, инсулин образуется из предшественника проинсулина путем отщепления пептида из 33 аминокислотных остатков с C-конца.

2) Химическая модификация. Например, при формировании молекул коллагена происходит гидроксилирование остатков лизина и пролина.

3) Присоединение простетической группы или нескольких протомеров.

Таким образом, первичная, вторичная третичная структура белков формируются в процессе трансляции по мере удлинения пептидной цепи, а четвертичная – в цитоплазме в процессе посттрансляционной достройки.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Особенности организации генетического материала у микроорганизмов.
- 2) IS-последовательности, транспозоны.
- 3) Плазмиды, виды в зависимости от свойств признаков, которые кодируют плазмиды.
- 4) Репликация ДНК.
- 5) Энзимология репликации.
- 6) Процесс транскрипции
- 7) Генетический код.
- 8) Свойства генетического кода.
- 9) Биохимические компоненты системы биосинтеза белка. Стадии трансляции.
- 10) Стадии образования пептидной цепи.
- 11) Посттрансляционная достройка белков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
3. Гуттман, Б. Генетика / Б. Гуттман, Э. Гриффитс, Д. Сузуки, Т. Куллис. – М.: ФАИР-пресс, 2004. – 520 с. – ISBN 5-8183-0816-2; ISBN 1-85168-304-6
4. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
5. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
6. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Наука, 2004. – 496 с. – ISBN: 5-94087-098-8

#### Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. *Глазко, В.И.* Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. *Сассон, А.* Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
4. *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

## НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

### 3.1. Технология создания гибридных молекул ДНК

Операция по получению рекомбинантных молекул состоит из нескольких этапов:

**1. Выделение чужеродной ДНК для переноса в другую клетку.** Ферменты рестриктазы разрушают чужеродную ДНК, разрезая ее на отдельные участки. Причем каждая рестриктаза может действовать только на определенную последовательность нуклеотидов – сайты, т.е. участки опознавания. При разрыве ДНК образуются фрагменты с односторонними участками на концах (липкие концы, т.к. комплементарны друг другу).

**2. Внедрение чужеродной ДНК в плазмиду; сшивание чужеродной ДНК с векторной ДНК.** Вектор способен переносить чужую ДНК внутрь бактерии, где она (эта ДНК) могла бы реплицироваться. Векторами могут быть плазмиды, бактериофаги, вирусы.

Плазмиды – это внехромосомные элементы, встречающиеся в клетке. Представляют собой замкнутые кольцевые молекулы двух цепочечной ДНК, способные реплицироваться независимо от геномной ДНК бактерии. Чтобы включить участок ДНК в плазмиду, замкнутое кольцо плазмиды разрывают воздействием рестриктаз. Из кольцевой плазмиды превращается в линейную структуру, в которой имеются липкие концы по отношению к фрагментам чужеродной ДНК.

Затем с помощью ферментов лигаз образуется плазмиды, которая называется рекомбинантной, с включенным участком чужеродной ДНК.

**3. Трансформация рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки.** Способы введения гибридной молекулы в бактерию или животную клетку зависят от вектора. Для бактерий – это трансформация, в случае использования фагов и вирусов – трансдукция.

Трансформация – это введение рекомбинантных плазмид в бактерии, обработанные специальным образом так, чтобы они стали проницаемыми для макромолекул. Однако плазмиды проникают лишь в часть обработанных бактерий. Каждая из трансформированных бактерий размножается и образует колонию, такая бактерия называется клон.

**4. Клонирование и скрининг клонов.** Скрининг – это отбор среди клонов трансформированных бактерий тех, которые содержат плазмиды, несущие нужный ген. Для этого все бактериальные колонии накрывают специальным фильтром, на нем остаются отпечатки колонии. Затем фильтры помещают в раствор с радиоактивно меченым зондом – полинуклеотидом, комплементарным исходному гену.

Радиоактивная метка позволяет найти среди множества клонов трансформированные бактерии, которые имеют плазмиды с нужным геном.

**5. Молекулярная гибридизация.** С помощью клонирования можно получить копии любого фрагмента ДНК человека или другого организма.

Доказано, что бактериальные гены в составе гибридных молекул функционируют нормально. Гены растений, животных в плазмиды встраиваются хорошо, размножаются в неограниченном количестве, матричная и-РНК на них образуется, но эукариотиче-



ский белок в бактериях не синтезируется. Так была открыта структура гена эукариот, состоящая из экзонов и интронов.

### 3.2. Свойства плазмид

Плазмиды – внехромосомные мобильные генетические структуры бактерий, представляющие собой замкнутые кольца двунигчатой ДНК. По размерам составляют 0,1 - 5 % ДНК хромосомы. Плазмиды способны автономно копироваться (реплицироваться) и существовать в цитоплазме клетки, поэтому в клетке может быть несколько копий плазмид. Плазмиды могут включаться (интегрировать) в хромосому и реплицироваться вместе с ней. Различают трансмиссивные и нетрансмиссивные плазмиды. Трансмиссивные (конъюгативные) плазмиды могут передаваться из одной бактерии в другую.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие: устойчивость к антибиотикам; образование колицинов; продукция факторов патогенности; способность к синтезу антибиотических веществ; расщепление сложных органических веществ; образование ферментов рестрикции и модификации.

Термин «плазмиды» впервые введен американским ученым Дж. Ледербергом (1952) для обозначения полового фактора бактерий. Плазмиды несут гены, не обязательные для клетки-хозяина, придают бактериям дополнительные свойства, которые в определенных условиях окружающей среды обеспечивают их временные преимущества по сравнению с бесплазмидными бактериями.

Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хромосомы так, что в каждой бактериальной клетке присутствует одна или, по крайней мере, несколько копий плазмид.

Число копий плазмид, находящихся под слабым контролем, может достигать от 10 до 200 на бактериальную клетку.

Для характеристики плазмидных репликонов их принято разбивать на группы совместимости. Несовместимость плазмид связана с неспособностью двух плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Несовместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сходством репликонов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же механизмом.

Некоторые плазмиды могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликона. Такие плазмиды называются интегративными или эписомами.

У бактерий различных видов обнаружены R-плазмиды, несущие гены, ответственные за множественную устойчивость к лекарственным препаратам – антибиотикам, сульфаниламидам и др., F-плазмиды, или половой фактор бактерий, определяющий их способность к конъюгации и образованию половых пилей, Ent-плазмиды, детерминирующие продукцию энтеротоксина.

Плазмиды могут определять вирулентность бактерий, например возбудителей чумы, столбняка, способность почвенных бактерий использовать необычные источники углерода, контролировать синтез белковых антибиотикоподобных веществ – бактериоцинов, детерминируемых плазмидами бактериоциногенности и т.д. Существование множества других плазмид у микроорганизмов позволяет полагать, что аналогичные структуры широко распространены у самых разнообразных микроорганизмов.

Плазмиды подвержены рекомбинациям, мутациям, могут быть элиминированы

(удалены) из бактерий, что, однако, не влияет на их основные свойства. Плазмиды являются удобной моделью для экспериментов по искусственной реконструкции генетического материала, широко используются в генетической инженерии для получения рекомбинантных штаммов. Благодаря быстрому самокопированию и возможности конъюгационной передачи плазмид внутри вида, между видами или даже родами плазмиды играют важную роль в эволюции бактерий.

### 3.3. Механизмы автономной репликации плазмидных ДНК

Как правило, репликацию плазмидной ДНК осуществляет тот же набор ферментов, что и дупликацию бактериальной хромосомы. Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хозяина, так что в каждой бактериальной клетке присутствует лишь одна или по крайней мере немного копий плазмиды. Число же копий плазмид, находящихся под ослабленным контролем, составляет 10 - 200. Число копий плазмид с ослабленным контролем в клетке можно увеличить до нескольких тысяч, если подавить синтез белков хозяина (например, обработав клетки хлорамфениколом).

Для того чтобы плазмиду можно было использовать в качестве вектора, она должна обладать следующими свойствами. Плаزمида должна быть небольшого размера, и ее репликация должна находиться под ослабленным контролем. Чтобы можно было выявлять трансформантов и поддерживать плазмиду в бактериальной популяции, она должна нести один или несколько таких маркеров, по которым можно вести отбор. Наконец, плазмида должна содержать единичный уникальный сайт для одного фермента рестрикции в области, которая не существенна для репликации плазмиды.

### 3.4. Критерии классификации плазмид

В 50-е гг. плазмиды R стали классифицировать на  $f_i^+$  и  $f_i^-$  (*по способности ингибировать перенос плазмиды F*). Далее стали, в зависимости от различия в пилых, выделять F и I-подобные плазмиды.

Современные подходы к классификации плазмид основаны на комплексном учете их генетических свойств.

Еще в ранних работах по изучению плазмид было замечено, что существуют факторы, препятствующие конъюгационному переносу плазмид от доноров к реципиентам, содержащим одинаковые и сходные плазмиды. Один из таких факторов – поверхностное исключение: в скрещиваниях плазмиды не переходит из клеток доноров в клетки реципиенты, содержащие сходную плазмиду. В результате поверхностного исключения перенос снижается в 10-400 раз по сравнению с нормой. Следующий фактор был открыт в 60-е гг. - летальный зиготиз. Смешивание клеток доноров с клетками реципиентами, добавленными в смесь в значительно меньшем количестве, чем клетки доноры, сопровождается снижением числа жизнеспособных зигот, наследующих донорский генетический материал. Наконец результативность переноса зависит от несовместимости плазмид. В наиболее простом виде несовместимость заключается в том, что при переносе одна из плазмид элиминируется. Если в клетке обе плазмиды сохраняются, то это указывает на их совместимость. Обычно несовместимы те плазмиды, контроль репликации которых одинаков.

**Поверхностное исключение и летальный зиготиз.** Поверхностное исключение (sfx) лучше всего исследовано в случае F-плазмид. Экспериментальные данные свиде-

тельствуют, что это свойство плазмид F детерминруется генами *tra S* и *tra T*. Мутации этих генов снижают *sfx* в 15-20 раз. Изучение роли белка *tra T* плазмид F показало, что этот белок либо снижает частоту формирования стойких клеточных агрегатов в процессе скрещивания клеток, либо связан с концом *f*-пили, предупреждая взаимодействие последней с поверхностью клетки реципиента. Белок *tra S* подавляет запуск конъюгационного метаболизма ДНК.

Клетки доноры F<sup>+</sup> становятся фенкопиями F<sup>-</sup> в поздней стационарной фазе развития при культивировании и имеют реципиентную способность. В фенкопиях продукт гена *tra T* также синтезируется, однако функционально не активен.

Поверхностное исключение обнаружено также в случае I-подобных плазмид.

Летальный зиготизм может проявляться если в скрещиваниях используются клетки реципиенты F<sup>-</sup>. Однако, если клетки, используемые в качестве реципиентов, содержат плазмиду F<sup>-</sup> - они иммунны к летальному зиготизму.

**Несовместимость и группы несовместимости.** К одной группе несовместимости (*inc*-группа) относят плазмиды, которые несовместимы между собой, но совместимы с любой плазмидой из другой группы. Существует более 30 *inc*-групп.

Когда плазмиды не трансмиссивны в *E. coli* их классифицируют в бактериях тех видов, в которых они выявлены. Плазмиды псевдомонад, не способные к переносу в *E. coli*, классифицированы в *Pseudomonas aeruginosa* и других псевдомонадах на 11 групп.

Плазмиды стрептококков и стрептомицетов также классифицированы на несколько *inc*-групп.

Для плазмид одной группы исключения сходна молекулярная масса, гомологичны многие последовательности нуклеотидов, сходны конъюгационные процессы, синтезируются серологически родственные пили. Как полагают многие исследователи, принадлежность плазмиды к той или иной группе несовместимости является отражением филогенеза последней.

Иногда проявляется атипичная несовместимость, когда плазмиды оказываются несовместимыми с плазмидами других групп несовместимости. Иногда одну плазмиду относят к нескольким *inc*-группам.

На данный момент предложено две модели механизма несовместимости:

Репликоновая – основана на гипотезе позитивного контроля. Предполагается, что несовместимость обуславливается конкуренцией плазмид за сайты прикрепления к мембране клетки. Однако к настоящему времени имеются данные, не укладывающиеся в такую модель.

Модель «разведения репрессора» - негативный контроль. Если плазмиды имеют одинаковые системы контроля копийности и, следовательно, обладают взаимной чувствительностью к детерминированию и репрессорам, то они будут несовместимы (т.к. в дочерние клетки разойдутся не копии одной плазмиды, а гомологичные несовместимые плазмиды, а синтез копий до деления клетки и тем самым разведения репрессора будет подавлен).

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Перечислите стадии технологии создания гибридных молекул ДНК.
- 2) Выделение чужеродной ДНК для переноса в другую клетку.
- 3) Внедрение чужеродной ДНК в плазмиду; сшивание чужеродной ДНК с векторной ДНК.
- 4) Трансформация рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки.
- 5) Клонирование и скрининг клонов.
- 6) Молекулярная гибридизация.

- 7) Свойства плазмид.
- 8) Механизмы автономной репликации плазмидных ДНК.
- 9) Критерии классификации плазмид.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
3. Гуттман, Б. Генетика / Б. Гуттман, Э. Гриффитс, Д. Сузуки, Т. Куллис. – М.: ФАИР-пресс, 2004. – 520 с. – ISBN 5-8183-0816-2; ISBN 1-85168-304-6
4. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
5. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
6. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Наука, 2004. – 496 с. – ISBN: 5-94087-098-8

### Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
4. 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

## ИНСТРУМЕНТАРИЙ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

### 4.1. Фрагментация и фракционирование ДНК

Основная проблема выделения нуклеиновых кислот заключается в получении клеток и отделении нуклеиновых кислот от связанных с ними белков и других клеточных компонентов. Помимо очистки нуклеиновых кислот от нежелательных компонентов, следует обратить внимание на то, что сами нуклеиновые кислоты требуют исключительно осторожного обращения, так как они чрезвычайно чувствительны к действию нуклеаз и гидродинамических сил. Клетки гомогенизируют различными методами, а из гомогената отделяют нуклеиновые кислоты. Из гомогената нуклеиновые кислоты можно выделить двумя методами, заключающиеся в "высаливании" ДНК различными смесями органических растворителей. Нуклеиновые кислоты остаются в водной фазе, в то время как другие денатурированные макромолекулы собираются на границе между фазами. Эти методы не позволяют выделить неповрежденными большие молекулы ДНК. Образовавшуюся гетерогенную смесь нуклеиновых кислот подвергают разделению на фракции методами ультрацентрифугирования, гель-фильтрации на сефадексах, хроматографированием. Полученные фракции ДНК подвергают секвенированию, для чего их подвергают действию эндонуклеаз рестрикции.

### 4.2. Энзимология молекулярного клонирования

Многие рестрицирующие нуклеазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов, так что на концах образуются короткие одноцепочечные участки. Эти одноцепочечные концевые участки обладают способностью образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента, и потому их называют липкими концами. Липкие концы, образованные рестрикторными ферментами, позволяют легко соединить два любых фрагмента ДНК воедино при условии, что эти фрагменты образовались после действия одной и той же рестрицирующей нуклеазы (рестриктазы). Таким образом, фрагмент ДНК любого происхождения можно встроить в очищенную ДНК автореплицирующегося генетического элемента, которым, как правило, является плазида или бактериальный вирус. Исходный фрагмент может происходить прямо из геномной ДНК, или из кДНК (комплементарной ДНК), т.е. из ДНК, полученной копированием матричной РНК.

### 4.3. Основные требования, предъявляемые к вектору

**Вектор** – молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК и обеспечивать там ее размножение (клонирование) или реже – включение в геном.

К векторам предъявляются определенные требования. Кольцевая молекула ДНК может реплицироваться в клетках, если содержит ДНК-репликатор (оп-последовательность). Вектор должен содержать уникальные сайты рестрикации для нескольких рестриктаз, обладать определенной емкостью и не выбрасывать встроенный фрагмент; маркерный ген, облегчающий отбор клеток, несущих вектор, чтобы ген экспрессировался (получался продукт, синтезированный по информации введенного гена);

специфические для данной клетки промоторы и терминаторы («стоп»-кодона) транскрипции.

#### 4.4. Типы векторов

В качестве векторов используют, как правило, плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы животных. В настоящее время создано большое число векторов, и по профилю использования их можно подразделить на несколько типов.

**Векторы для клонирования фрагмента ДНК.** Для этого используются чаще бактериальные плазмиды и фаги.

**Экспрессионные векторы.** Их используют для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуктов, а также наработок конкретного белка. Экспрессионные векторы для эукариотических организмов всегда содержат так называемую экспрессионную кассету, состоящую из промотора, способного работать в данном организме, и сайта полиаденилирования.

**Векторы для трансформации.** Используются для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента. Обычно такие векторы содержат специфические последовательности, способствующие интеграции в геном.

Современные векторные системы часто бывают полифункциональными, совмещая несколько функций в одном векторе. Большинство из них сконструировано при помощи методов генной инженерии.

В качестве векторов прокариот используют плазмиды, фаги и их комбинации. Плазмидные векторы используются чаще всего для размножения (клонирования) гена. Для прокариот сконструированы векторы на основе фага X, в которые можно включать фрагменты чужеродной ДНК до 22 т.н.п. Из генома фага вырезают его собственную ДНК, оставляя концевые фрагменты фага неизменными, так как они необходимы для репликации и упаковки ДНК в головку фага (cos-сайты).

Для клонирования и переноса более крупных фрагментов ДНК (30-45 т.н.п.) были сконструированы искусственные векторы – космиды, содержащие cos-участок генома фага, за счет чего они могут упаковываться в голову фага X и специальные последовательности (ori-сайт), позволяющие им реплицироваться по плазмидному типу.

Космидами трансформируют клетки *E. coli*, где они размножаются как плазмиды, и каждая фаговая частица вызывает образование колонии индивидуального бактериального трансформанта.

Клонирование фрагментов ДНК от 100 т.н.п. и более осуществляют в специально сконструированных векторах ВАС и VАС. ВАС-векторы получены на основе F-плазмид бактерий и содержат гены, ответственные за репликацию и копияность этих плазмид в бактериальных клетках. Емкость ВАС-векторов составляет 100-300 т.н.п.

VАС-векторы представляют собой искусственную дрожжевую минихромосому, содержат центромеру, теломеру и точку начала репликации. В такой вектор можно встроить фрагмент чужеродной ДНК более 100 т.н.п., и такая минихромосома, введенная в клетки дрожжей, будет реплицироваться и вести себя аналогично другим дрожжевым хромосомам при митозе.

Эукариотические вирусы нашли более скромное применение в качестве векторов.

Практически используется только онкогенный вирус SV-40 и его производные. Все эти векторы – дефектные вирусы, не способные дать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина.

Для переноса генов в клетки растений широко используются Ti-плазмиды почвен-

ных агробактерий (*Agrobacteria*). Последние могут заражать двудольные растения и вызывать образование опухолей – корончатых галлов. Опухоли состоят из дедифференцированных клеток, интенсивно делящихся и растущих в месте заражения. В бактериальных клетках Ti-плазмиды (англ. «tumor inducing» - индуцирующие опухоли) реплицируются автономно; их кольцевая ДНК длиной около 200 т.н.п. Чаще всего встречаются Ti-плазмиды, кодирующие аминокислоты нопалин или октопин. После заражения фрагмент ДНК Ti-плазмиды встраивается в ДНК растительной клетки, изменяя ее метаболизм и заставляя синтезировать вещества (опины), необходимые бактерии. Этот фрагмент ДНК Ti-плазмиды назван т-ДНК (транс-формирующая ДНК); его длина примерно 23 т.н.п. На концах т-ДНК находятся прямые повторы (25 н.п.), которые (наряду с *vir*-областью) необходимы для вырезания ее из состава плазмиды и интеграции в геном растений.

Природная Ti-плазида очень велика, и после трансформации растений клетки не будут способны к регенерации. В настоящее время конструируют производные Ti-плазмиды, в которых вставляют регуляторный участок T-области, а вместо ее структурных генов вшивают структурную часть гена, который надо ввести в растение. Такие гены безвредны для растения. На основе Ti-плазмиды сконструированы промежуточный и бинарный векторы.

Перспективным вектором считаются Ri-плазмиды (англ. «root inducing» - индуцирующий корни) из бактерий (*A. rhizodenes*), вызывающих усиленное образование корешков при заражении бактерий. В отличие от Ti-плазмид Ri-плазмиды служат естественными безвредными векторами, так как трансформированные с их помощью растительные клетки сохраняют способность к морфогенезу и к регенерации здоровых растений.

В качестве векторов растений используются ДНК-содержащие вирусы (их только 1-2 % от вирусов, инфицирующих растения). Это содержащий одноцепочечную ДНК вирус золотой мозаики фасоли (ВЗМФ) или вирус полосатой кукурузы, а также вирус с двухцепочечной ДНК - вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), поражающий в основном растения семейства крестоцветных. Фитовирусы отличаются высокой копийностью (10<sup>6</sup> молекул на зараженную клетку), малым размером, сильными промоторами. Однако фитовирусы имеют ряд недостатков: небольшую емкость, патогенность и неспособность встраиваться в хромосомы хозяина. Иногда геном ВМЦК встраивают в T-область Ti-плазмиды и в ее составе интегрируют в ядерный геном различных растений, при этом из состава фитовируса вырезаются области, обеспечивающие его вирулентность.

#### 4.5. Методы введения гибридных ДНК в клетку

Для введения чужеродной ДНК в клетки бактерий используются два метода.

1) Первый основан на использовании плазмиды в качестве вектора. Для трансформации плазмиды в бактериальную клетку, культуру клеток *Escherichia coli* обрабатывают солями кальция и кратковременно нагревают до 42 °С с последующим резким охлаждением до 0°С. Это приводит к модификации структур поверхностного аппарата клетки, и клетки активно захватывают плазмиды. Однако далеко не все клетки получают плазмиду. Чтобы отличить трансформированные клетки от нетрансформированных, в геном плазмиды вводят гены, кодирующие устойчивость к различным антибиотикам. Бактерии, имеющие такие гены, способны расти на средах содержащих соответствующий антибиотик. После завершения трансформации клетки *Escherichia coli* помещают в

чашку Петри с агаризованной средой, в которую добавлен, например, ампицилин. Клетки, не получившие плазмиду, и соответственно, ген устойчивости к ампицилину погибают. Клетки же содержащие плазмиду выживают и дают начало колонии, все клетки которой содержат плазмиды. Для того, чтобы клетки *Escherichia coli* случайно не утратили плазмиду, их постоянно культивируют на среде, содержащей антибиотик. Так как до трансформации в плазмиду был встроен какой-нибудь ген эукариотической клетки, получается, что все бактерии такой культура его содержат.

2) Второй метод, которым исследователи пользуются для введения гена в бактериальные клетки, основан на применении бактериофагов в качестве вектора. Ген, теми же методами, что и в плазмиду, встраивают в бактериофаг. Чаще всего для этих целей используются фаги, M13 и X174. После этого культуру клеток *Escherichia coli* заражают фагом. Фаг проникает в клетку, используя соответствующие рецепторы, имеющиеся на поверхности клеточной мембраны. Вместе с фагом в клетку проникает и встроенный в ДНК фага ген эукариотической клетки, который реплицируется вместе с генами бактериофага при размножении последнего в клетке. Преимущество использования бактериофагов вместо плазмид состоит в том, что в бактериофаг можно встроить значительно более длинный фрагмент чужеродной ДНК, чем в плазмиду. Кроме того, бактериофаги могут встраиваться в бактериальную хромосому и передаваться всем потомкам данной клетки.

#### 4.6. Экспрессия клонированных генов

Успешное осуществление процедуры клонирования чужеродного гена в нужном организме - хозяине еще не означает, что этот ген обязательно будет эффективно экспрессирован. Это обусловлено тем, что, обычно, кодируемый этим геном белок не только не нужен клетке, но и дополнительно требует для своего синтеза энергию (АТФ) и различные метаболиты (аминокислоты, азотистые основания, моносахариды и т.д.), что замедляет или даже нарушает процессы нормального клеточного метаболизма. В то же время, чтобы получение целевого продукта было экономически оправданным, уровень его синтеза должен быть достаточно высоким.

Поэтому подбор оптимальных условий для эффективной экспрессии (транскрипции и трансляции) клонируемого гена является одной из ключевых операций генетической инженерии.

Никакой универсальной стратегии оптимизации экспрессии клонированных генов не существует. Большинство таких генов имеют уникальные молекулярные свойства, и оптимальные системы экспрессии для каждого из них приходится подбирать индивидуально. Эффективность экспрессии любого чужеродного гена существенно зависит от степени родства организма донора ДНК с организмом хозяином. Несмотря на то, что многие представители как про-, так и эукариотических организмов способны к экспрессии чужеродных генов, для получения важных в коммерческом отношении продуктов с помощью технологии рекомбинантных ДНК используют в основном *Escherichia coli*. Это связано, прежде всего, с тем, что сейчас достаточно хорошо изучены многие генетические, молекулярно-биологические, биохимические и физиологические свойства этого микроорганизма. Кроме того, он достаточно хорошо культивируется в обычных условиях на дешевых и простых питательных средах и является безопасным в обращении. Помимо *Escherichia coli* для экспрессии некоторых клонированных генов используются и другие организмы-хозяева: *B. subtilis*, дрожжи, животные, растения и т. д., хотя стратегии, разработанные для *E. coli*-систем, в принципе применимы и в этих случа-



ях.

#### 4.7. Селекция рекомбинантов

**Обнаружение нужного клона.** Идентификация клона основывается на том, что вставка в рекомбинантной ДНК детерминирует какое-то уникальное свойство содержащей ее клетки. Это свойство может определяться структурой самой вставки либо быть связанным с ее функцией. На нем основывается скрининг популяции клонов с целью идентификации одного нужного клона. Методы скрининга должны быть очень чувствительными, поскольку иногда приходится идентифицировать один клон из сотен тысяч или даже миллионов клонов.

**Отжиг с комплементарным полинуклеотидом.** Комплементарные одноцепочечные полинуклеотиды, будь то РНК или ДНК, при соответствующих условиях с легкостью ренатурируют, несмотря на присутствие большого избытка неродственных цепей. Благодаря этому исследователь получает мощный инструмент для обнаружения специфической вставки, который можно использовать в разных ситуациях.

**Отжиг с радиоактивным зондом.** Предположим, что мы имеем большую популяцию клонированных рекомбинантных молекул и проводим отжиг с определенным полинуклеотидным зондом. Тогда мечеными становятся только те рекомбинантные молекулы, которые содержат последовательности, комплементарные зонду. Успех эксперимента зависит прежде всего от наличия нужного зонда.

**Скрининг 8У40-бляшек.** Метод состоит в том, что бактериальные колонии или бляшки переносят с агара на иммобилизованную подложку, например, на нитроцеллюлозный фильтр, и подвергают содержащуюся в них ДНК денатурации. Затем фильтр инкубируют в растворе, содержащем денатурированный <sup>32</sup>P-меченный зонд, в условиях, способствующих ренатурации комплементарных цепей. Если колония или бляшка содержит ДНК, комплементарную зонду, то на радиоавтограмме в соответствующем месте будет наблюдаться потемнение. Несмотря на то, что каждая бляшка или колония содержит лишь небольшое количество ДНК, ее удастся выявить благодаря высокой удельной радиоактивности зондов.

**Определение экспрессии гена в клетках.** Экспрессирующийся ген, входящий в состав рекомбинантной ДНК, при определенных условиях придает клетке-хозяину специфические фенотипические свойства. Метод отбора, основанный на выявлении этого фенотипа, позволяет идентифицировать и выделять соответствующий клон точно так же, как стандартные селективные маркеры в векторных молекулах позволяют отбирать трансформированные клетки. К стандартным селективным маркерным системам, относятся клетки *E. coli*, утратившие в-лактамазу, которые используются для отбора трансформантов, содержащих векторы с геном *amp*, а также клетки млекопитающих, имеющие фенотип ТК-, которые позволяют отобрать трансформанты, содержащие векторы с геном тимидинкиназы.

**Фенотипический отбор.** Фенотипический отбор из популяции трансформированных клеток – это самый прямой путь выделения нужного клона. На практике этот метод, ограничивается клонированием прокариотических генов и некоторых генов дрожжей и других грибов в клетках прокариот и эукариотических генов в клетках эукариот. Чтобы клонировать ген А, смесь фрагментов ДНК встраивали в векторные молекулы и трансфицировали ими клетки, мутантные по гену А. Клетки выращивали в условиях, требующих присутствия продукта гена А, так что колонии могли образовывать лишь те клетки, в которых синтезируется продукт гена А, присутствующего в век-

торе. Наиболее подходящими для проведения такого отбора являются клетки-хозяины, в которых делетирован либо весь ген А, либо его часть. В противном случае приходится выявлять и разграничивать ревертанты и трансформанты. Кроме того, делеционные мутанты исключают вероятность проявления фенотипа А<sup>+</sup> в результате супрессии фенотипа А - какими-то другими генами.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Фрагментация и фракционирование ДНК.
- 2) Энзимология молекулярного клонирования.
- 3) Векторы. Основные требования, предъявляемые к вектору.
- 4) Типы векторов.
- 5) Векторы, используемые для переноса генов в клетки растений.
- 6) Методы введения гибридных ДНК в клетку.
- 7) Экспрессия клонированных генов.
- 8) Селекция рекомбинантов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
2. *Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
3. *Гуттман, Б.* Генетика / Б. Гуттман, Э. Гриффитс, Д. Сузуки, Т. Куллис. – М.: ФАИР-пресс, 2004. – 520 с. – ISBN 5-8183-0816-2; ISBN 1-85168-304-6
4. *Мушкамбаров, Н.Н.* Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
5. *Сазыкин, Ю.О.* Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
6. *Щелкунов, С.Н.* Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Наука, 2004. – 496 с. – ISBN: 5-94087-098-8

#### Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. *Глазко, В.И.* Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. *Сассон, А.* Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
4. *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

## **СИСТЕМА БЕЗОПАСНОСТИ В ОБЛАСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ (ГИД)**

### **5.1. Возможные аспекты биологической опасности и экологические риски генетически модифицированных организмов**

Генно-инженерные технологии являются величайшим достижением молекулярной биологии и молекулярной генетики. Они могут быть широко использованы при решении обширного спектра фундаментальных и прикладных задач: лечении наследственных заболеваний; создании лекарственных препаратов нового поколения и косметических средств; получении технического сырья; конструировании новых сортов сельскохозяйственных культур; получении трансгенных животных с заданными хозяйственно ценными признаками; создании популяций животных, генетически устойчивых к инфекционным заболеваниям; выведении животных, являющихся продуцентами биологически активных веществ для медицинских целей; создании животных - доноров отдельных органов и тканей для человека, а также организмов, обладающих свойствами, не имеющими аналогов в природе.

Серьезная угроза исходит и от успехов этих высоких технологий, поскольку возможны: трансграничный перенос патогенных микроорганизмов, представителей флоры и фауны, опасных для экосистем; неконтролируемый трансграничный перенос и интродукция чужеродных видов, включая ГМО и корма, полученные на их основе; неконтролируемая генно-инженерная деятельность и генотерапия.

Генно-инженерные технологии нашли наиболее широкое применение при конструировании новых сортов сельскохозяйственных культур, что выдвигает особые требования к безопасности продуктов питания. Объективными источниками наличия реальных или потенциальных биологических рисков генетически модифицированных (ГМ) продуктов питания являются:

- непредсказуемость встраивания чужеродного фрагмента ДНК в геном растения;
- слабая изученность механизмов регуляции и функционирования генов высших растений;
- наличие плейотропного эффекта встроенного трансгена;
- нарушение стабильности генома и изменение его функционирования вследствие процесса трансформации;
- нарушение стабильности встроенного в геном чужеродного фрагмента ДНК;
- наличие во встроенном фрагменте ДНК «технологического мусора», в том числе генов устойчивости к антибиотикам и вирусных промоторов;
- аллергические эффекты чужеродного белка;
- токсические эффекты чужеродного белка.

В соответствии с Международной конвенцией по устойчивому развитию и окружающей среде (Рио-де-Жанейро, 1992) вся тяжесть доказательства безопасности продуктов питания, в том числе и генетически модифицированных, ложится на производителя. В случае отсутствия подобных доказательств ГМ продукты питания следует считать опасными или потенциально опасными, пока не будет доказано обратное.

## 5.2. Функции межведомственной комиссии по проблемам ГИД

Постановлением Правительства Российской Федерации от 22 апреля 1997 г. № 464 утверждено Положение о Межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности.

Межведомственная комиссия по проблемам генно-инженерной деятельности создана в целях координации действий по реализации Федерального закона "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности".

### *Основными задачами Комиссии являются:*

- обеспечение создания и совершенствования инфраструктуры и системы контроля в области обеспечения безопасности генно-инженерной деятельности;
- обеспечение разработки правил безопасного получения, использования и передачи генно-инженерно-модифицированных организмов и их фрагментов;
- обеспечение создания и поддержания централизованного банка данных в области генно-инженерной деятельности и биобезопасности;
- координация разработки и реализации разрешительно-уведомительной системы при осуществлении генно-инженерной деятельности на основе оценки и управления потенциальными рисками;
- координация деятельности федеральных органов исполнительной власти, органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации, научных, производственных организаций и учебных заведений в области разработки порядка и обеспечения безопасной передачи генно-инженерно-модифицированных организмов, их фрагментов и генно-инженерных технологий;
- координация деятельности федеральных органов исполнительной власти, органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации по разработке нормативных правовых актов, регулирующих генно-инженерную деятельность;
- обеспечение разработки предложений по развитию приоритетных направлений генно-инженерной деятельности в Российской Федерации;
- контроль за гармонизацией механизма обеспечения биобезопасности в Российской Федерации с действующими международными аналогами;
- представление в Правительство Российской Федерации ежегодного доклада об обеспечении биобезопасности в стране.

## 5.3. Факторы риска

***Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека в замкнутых системах.*** При оценке риска ГИД в замкнутых системах в первую очередь оцениваются факторы риска для здоровья человека и животных, так как высвобождения ГИО в окружающую среду не предусматривается. К их числу можно отнести следующие потенциально опасные эффекты ГИО:

- Возможные токсичные (включая канцерогенные, мутагенные) и (или) аллергенные эффекты ГИО или продуктов их метаболизма.
- Вероятные вредные воздействия целевых продуктов ГИД (возможных токсинов, цитокинов, аллергенов, гормонов и других биологически активных веществ, которые могут вызвать неблагоприятные последствия при попадании в чувствительные органы, ткани организма человека и животных).
- Сравнительная патогенность генно-инженерных микроорганизмов по сравнению с донором, реципиентом (исходным родительским организмом).

- Способность к микробному обсеменению (колонизации).
- Если ГИО является патогенным по отношению к иммунокомпетентным людям, кроме прочих рассматриваются следующие факторы его патогенности: тип вызываемого заболевания; механизм патогенности, включающий способ проникновения патогенного организма и вирулентность; инфекционная доза; спектр возможных носителей и возможность его изменения; возможность выживания ГИО вне организма человека; биологическая стабильность ГИО и способ его распространения.

**Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека, связанной с высвобождением ГИО в окружающую среду или их использованием в хозяйственной деятельности.** Высвобождение патогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду не предусматривается. Поэтому основными факторами риска для здоровья человека высвобожденных или поступивших на товарный рынок ГИО являются их вероятная токсичность и аллергенность. В целом к факторам риска в данном контексте можно отнести:

- токсичность ГИО (продуктов, изготовленных из ГИО, включающих ГИО) и снижение питательной ценности продуктов питания и кормов;
- аллергенность ГИО (продуктов, изготовленных из ГИО, включающих ГИО);
- перенос трансгенов микроорганизмам, обуславливающий их устойчивость к лекарственным препаратам, применяемым для лечения человека и животных (на пример, маркерных трансгенов устойчивости к антибиотикам);
- непреднамеренная экспрессия генов реципиентного организма или нестабильность трансгенов.

Таким образом, основными факторами риска, которые могут вызвать неблагоприятные последствия для здоровья человека, являются: 1) потенциальная патогенность ГИО; 2) потенциальная токсичность ГИО и новых продуктов питания; 3) потенциальная аллергенность ГИО и новых продуктов питания; 4) возможность горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам от ГИО патогенной микрофлоре желудочно-кишечного тракта человека.

#### **5.4. Уровни риска генно-инженерных работ – базовые принципы и методология оценки**

В соответствии с Федеральным законом от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности" (с изменениями и дополнениями от: 12 июля 2000 г., 30 декабря 2008 г., 4 октября 2010 г., 19 июля 2011 г.) в зависимости от степени потенциальной опасности, возникающей при осуществлении генно-инженерной деятельности, для замкнутых систем устанавливается четыре уровня риска потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека:

**I уровень риска** соответствует работам, которые не представляют опасности для здоровья человека, и сопоставим с риском при работе с непатогенными микроорганизмами;

**II уровень риска** соответствует работам, которые представляют незначительную опасность для здоровья человека, и сопоставим с опасностью при работах с условно-патогенными микроорганизмами;

**III уровень риска** соответствует работам, которые представляют умеренную опасность для здоровья человека, и сопоставим с опасностью при работах с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции;

*IV уровень риска* соответствует работам, которые представляют опасность для здоровья человека, и сопоставим с опасностью при работах с возбудителями особо опасных инфекций.

Работы, проводимые с микроорганизмами в замкнутых системах в масштабе, превышающем лабораторные исследования, относятся к III или IV уровню риска.

### **5.5. Понятия биологической защиты работников, населения, окружающей среды**

Для защиты окружающей природной среды от биологического загрязнения применяются следующие меры:

- санитарная охрана территории,
- введение в необходимых случаях карантина,
- постоянный эпиднадзор за циркуляцией вирусов,
- регулярные эколого-эпидемиологические наблюдения,
- слежение и контроль за очагами опасных вирусных инфекций;
- обоснование и прогнозирование последствий интродукции и акклиматизации новых для данной территории видов растений и животных;
- профилактические меры по недопущению переноса генетической информации от домашних форм к диким видам;
- снижение риска генетического загрязнения генофонда редких и исчезающих видов.

### **Вопросы для самоконтроля**

- 1) Возможные аспекты биологической опасности и экологические риски генетически модифицированных организмов.
- 2) Спектр фундаментальных и прикладных задач, решаемых с помощью генно-инженерных технологий.
- 3) Потенциальные угрозы генно-инженерных технологий.
- 4) Объективные источники наличия реальных или потенциальных биологических рисков генетически модифицированных (ГМ) продуктов питания.
- 5) Межведомственная комиссия по проблемам ГИД и ее задачи.
- 6) Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека в замкнутых системах.
- 7) Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека, связанной с высвобождением ГИО в окружающую среду или их использованием в хозяйственной деятельности.
- 8) Основные факторы риска, которые могут вызвать неблагоприятные последствия для здоровья человека.
- 9) Уровни риска генно-инженерных работ.
- 10) Понятия биологической защиты работников, населения, окружающей среды.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

#### **Основная**

1. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
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 / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2

#### Дополнительная

1. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
2. Донченко, Л.В. Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надывка. – М.: Пищепромиздат, 2001. – 528 с.
3. Закревский, В.В. Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище : практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору / В.В. Закревский. – СПб. : ИОРД, 2004. – 275 с. – ISBN 5-901065-81-6
4. Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования. Дата введения 1977-01-01 // Межгосударственный стандарт. ГОСТ 12.1.008-76. Группа Т58. Утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 10 марта 1976 года № 578. Переиздание. Сентябрь 1999 г.
5. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.
6. Журнал «Биотехнология».
7. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.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>)

## СОВРЕМЕННЫЕ МИКРОБНЫЕ ФАКТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ, СВЯЗАННЫЕ С БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ

### 6.1. Прионы

Прионы (от англ. proteinaceous infectious particles – белковые заразные частицы) – особый класс инфекционных агентов, чисто белковых, не содержащих нуклеиновых кислот, вызывающих тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных.

Прионный белок, обладающий аномальной трёхмерной структурой, способен прямо катализировать структурное превращение гомологичного ему нормального клеточного белка в себе подобный (прионный), присоединяясь к белку-мишени и изменяя его конформацию. Как правило, прионное состояние белка характеризуется переходом  $\alpha$ -спиралей белка в  $\beta$ -слои.

Пути переноса причинного фактора болезни, механизмы проникновения прионов в организм и патогенез заболевания изучены пока недостаточно.

Прионовые белки млекопитающих не сходны с прионовыми белками дрожжей по аминокислотной последовательности. Несмотря на это, основные структурные особенности у них общие.

До конца механизм спонтанного возникновения прионных инфекций не ясен. Считается (но ещё не полностью доказано), что прионы образуются в результате ошибок в биосинтезе белков. Есть данные, дающие основание считать, что прионы являются не только инфекционными агентами, но и имеют функции в нормальных биопроцессах.

Человек может заразиться прионами, содержащимися в пище, так как они не разрушаются ферментами пищеварительного тракта. Беспрепятственно проникая через стенку тонкого кишечника, они в конечном итоге попадают в центральную нервную систему.

Прионы могут проникать в тело и парентеральным путем.

Особую группу прионовых заболеваний представляют собой наследственные (врожденные) болезни, вызванные мутацией гена прионного белка, который делает возникший прионовый белок более подверженным спонтанному изменению пространственной конфигурации и превращения их в прионы.

Очень мало известно о молекулярном характере прионов, вызывающих заболевания. Заражение могут вызвать примерно 100 000 молекул, которые в большинстве случаев образуют большие скопления. Значение агрегации отдельных молекул в ассоциации для вирулентности прионов – устойчивость к действию ферментов, расщепляющих белки, ставшие ненужными. Нельзя исключить, что вирулентными являются и отдельные молекулы прионов. Из некоторых экспериментов следует, что для возникновения прионов в ткани достаточно лишь временного контакта ткани с материалом, содержащим прионы, и нет необходимости, чтобы прионы были навсегда внесены в организм. Этот риск является актуальным, например, в связи с использованием хирургических инструментов, заражённых прионами. Процесс трансформации «здоровых» прионовых белков в прионы может быть инициирован простым контактом здоровых тканей с прионами, зафиксированными на хирургическом инструменте.



## 6.2. Биопленки

**Биопленка** – сообщество микробов, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфичных генов. Это определение позволяет отличить микробные сообщества биопленок от похожих на них лишь внешне структур, например, колонии бактерий, растущих на поверхности агара, которые не проявляют ни одной из характеристик, свойственных истинной биопленке.

Современная биотехнология позволяет успешно использовать оптимальное сообщество микроорганизмов для выполнения определенных функций. Это актуально в производстве пищевых продуктов, лекарств и пищевых добавок, утилизации разного рода отходов, нейтрализации загрязнений воды и почвы нефтепродуктами. Такие сообщества называют иногда консорциумами микроорганизмов. Практика показала многократное увеличение эффективности работы микроорганизмов при такой организации.

*Выделяют пять стадий развития биопленки:*

1. Сначала происходит первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия, сорбция) из окружающей среды (обычно жидкости). Эта стадия обратима.

2. Окончательное (необратимое) прикрепление, иначе называемое фиксацией. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочную адгезию.

3. Созревание (в англоязычной литературе – созревание-I). Клетки, прикрепившиеся к поверхности, облегчают прикрепление последующих клеток, внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию. Накапливаются питательные вещества, клетки начинают делиться.

4. Рост (в англоязычной литературе – созревание-II). Образована зрелая биопленка, и теперь она изменяет свой размер и форму. Внеклеточный матрикс служит защитой клеток от внешних угроз.

5. Дисперсия (выброс бактерий): в результате деления периодически от биопленки отрываются отдельные клетки, способные через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию.

*Основные свойства биопленки:*

- взаимодействующая общность разных типов микроорганизмов;
- микроорганизмы собраны в микроколонии;
- микроколонии окружены защитным матриксом;
- внутри микроколоний различная среда;
- микроорганизмы имеют примитивную систему связи;
- микроорганизмы в биопленке устойчивы к антибиотикам, антимикробным средствам и реакции организма хозяина.

Для микробов, присутствующих в производственном процессе, характерен рост с образованием биопленки, т.е. с прикреплением к поверхности, и свободный, т.е. планктонный, рост. Ряд проблем в промышленности вызван биопленками, то есть слоями слизи, которые образуются на поверхностях производственного оборудования и могут отрываться от поверхностей. Отложения микроорганизмов на поверхностях машин и свободные биопленки/агломераты могут быть причиной серьезных нарушений технологического процесса: снижения потока воды; блокирования фильтров, сеток и т.п.; снижения качества конечного продукта, например из-за появления отверстий или цвет-

ных пятен в конечном продукте.

Биопленки трудно удалить с поверхностей производственного оборудования, и часто для этого нужно использовать очень сильнодействующие химические вещества. Для борьбы с размножением микробов в технические воды добавляют, например, биоциды.

### 6.3. Системы quorum sensing

Quorum sensing – способность некоторых микробных процессов реализовываться только при наличии достаточной плотности микроорганизмов (кворума) в биофильмах, в популяции кишечных патогенов пищеварительной системы животных и др.; обеспечивает координированное коллективное поведение популяции этих микроорганизмов. Основан на сигнальном механизме, который осуществляется с помощью выделения бактериями при высокой плотности популяции специфических химических веществ (низкомолекулярных аутоиндукторов), взаимодействующих с рецепторными регуляторными белками. Большинство грамотрицательных бактерий используют в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны. У ряда микроорганизмов плотностно-зависимые генные системы находятся под контролем других регуляторных механизмов, в том числе зависимых от циклического АМФ (напр., у *V. fischeri*). Системы quorum sensing оценивают не только плотность популяции, но и другие параметры внешней среды посредством соответствующих генных регуляторов. Quorum sensing играет ключевую роль в регуляции многих метаболических процессов у микроорганизмов; например, биолуминисценции у морских бактерий, формирования клеточ-швермеров у бактерий родов *Proteus* и *Serratia*, споруляции у бацилл и актиномицетов, стимуляции роста стрептококков, синтеза антибиотиков и др.

#### Вопросы для самоконтроля

- 1) Прионы.
- 2) Понятие о биопленке.
- 3) Стадии развития биопленки.
- 4) Основные свойства биопленки.
- 5) Системы quorum sensing.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

##### Основная

1. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
2. Биотехнология. Биобезопасность. Биозтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. Иммуно- и нанобиотехнология / Э.Г. Деева [и др.]. – Спб.: «Проспект Науки», 2008. – 192 с. – ISBN 978-5-903090-16-7
5. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформгенство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6

Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. Закревский, В.В. Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище : практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору / В.В. Закревский. – СПб. : ИОРД, 2004. – 275 с. – ISBN 5-901065-81-6
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. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
6. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
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
8. Журнал «Биотехнология».
9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
10. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
11. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
12. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

## ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРОИЗВОДСТВА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

### 7.1. Тенденции инфекционной заболеваемости в современном мире. Эмерджентные инфекции

Инфекционные заболевания – одна из самых серьезных угроз современному обществу, несмотря на очевидные успехи человечества в борьбе с ними. Сегодня мир снова оказался в ситуации, когда эпидемии бесконтрольно распространяются по земному шару вследствие изменившихся условий жизни (урбанизация, ухудшение социально-экологических условий жизни, новые технологии в медицине и производстве продуктов питания, резко возросшие миграционные процессы, международный туризм и торговля, микробные адаптации и мутации, изменение экологии тела человека, разрушение природных экологических систем и др.)

ВОЗ признает инфекции второй ведущей причиной смертности и первой причиной преждевременной смертности в мире. По данным ВОЗ, в мире ежегодно 2 млрд. людей болеет и свыше 17 млн. человек умирает от инфекционных болезней. Ежедневно от инфекций умирает 50 тыс. человек. Около 50% населения планеты проживает в условиях постоянной угрозы эндемических инфекций.

*К инфекционным биологическим рискам относятся:*

- массовые инфекционные заболевания – эпидемии, вспышки, пандемии, эпизоотии, эпифитотии (инфекционные болезни растений);
- естественные резервуары патогенных микроорганизмов (грызуны, клещи, птицы);
- искусственные резервуары патогенных микроорганизмов (сибирязвенные скотомогильники, биотермические ямы, коллекции штаммов музейных культур в НИИ, лабораториях, на биофабриках);
- генетически модифицированные возбудители инфекционных заболеваний.

*Наибольшую биологическую угрозу представляют:*

- преодоление микроорганизмами межвидовых барьеров (антропозоозы, инфекции отдаленных биологических видов);
- «возвращающиеся» (re-emerging), управляемые с помощью вакцинации инфекции, активизировавшиеся после периода эпидемиологического благополучия вследствие свертывания программ иммунизации населения;
- инфекции, возникающие на новых территориях (завоз редких или ранее не встречавшихся инфекций);
- новые (emerging) инфекции, вызываемые ранее неизвестными патогенами (за последние 35 лет выделен и идентифицирован 41 новый патоген);
- возрастание эпидемиологического значения условно-патогенных микроорганизмов и увеличение частоты заболеваемости оппортунистическими инфекциями (инфекции, проявляющиеся у лиц с иммунодефицитными состояниями любой природы);
- распространение нозокомиальных (госпитальных) инфекций;
- аварии и диверсии на объектах, где проводятся работы с патогенными микроорганизмами;
- биологический терроризм во всех его проявлениях.

## **7.2. Создание более совершенных средств обнаружения и защиты от биологических поражающих агентов**

*В общем случае противобиологическая защита включает в себя:*

- биологический контроль и оценку (прогнозирование) биологической обстановки;
- использование индивидуальных и коллективных средств защиты;
- специальную обработку, включая санитарную обработку личного состава, дезинфекцию объектов, местности, дорог, сооружений;
- экстренную (общую и специальную) профилактику поражений и вакцинацию (ревакцинацию);
- изоляционно-ограничительные и лечебно-эвакуационные мероприятия;
- маневрирование мобильными резервами.

Для решения задач биомониторинга необходима разработка высокочувствительных и специфических (селективных) методов индикации патогенов, экопатогенов и создания на основе этих методов современных технических средств.

В зависимости от назначения и принципа действия средства системы биологического и экологического мониторинга окружающей среды должны включать следующие классификационные группы:

- автоматические сигнализаторы биологических аэрозолей;
- автоматические анализаторы биологических средств;
- высокопроизводительные пробоотборные устройства биологических аэрозолей;
- автоматические (полуавтоматические) приборы индикации биологических объектов;
- аппаратура, приборы, наборы, комплекты и устройства обнаружения и идентификации биологических объектов;
- аппаратура управления, сбора и обработки данных.

Автоматические анализаторы биологических средств в режиме периодического функционирования должны обеспечивать дифференциацию биологических средств, находящихся в аэрозольном состоянии, на следующие условно таксономические группы: вирусы, риккетсии, бактерии (отдельно вегетативные и споровые формы), бактериальные токсины.

## **7.3. Обеспечение безопасности работ в микробиологических лабораториях**

Наиболее высокий уровень биорисков наблюдается при работе с патогенными микроорганизмами.

За последние 70 лет зарегистрировано более 5400 лабораторных несчастных случаев, около 100 инцидентов, связанных с выходом в окружающую среду патогенных биологических агентов от биотехнологических производств. Поэтому важнейшей задачей является обеспечение биобезопасности при работе с патогенными биологическими агентами в микробиологических лабораториях и производствах.

Ранжирование риска, связанного с возбудителями болезней, производится на основе оценки эпидемической и клинической опасности патогенных биологических агентов с включением категорий биорисков:

- биориск - индивид;
- биориск - профессиональная группа работающих;
- биориск - популяция целой территории (население страны и группы стран).

Для различных групп/категорий лабораторных инфекций разработаны практические руководства, в которых описывается соответствующее оборудование для безопасного хранения биологического материала, необходимое оснащение и мероприятия, которые должен выполнять персонал лабораторий. Эти руководства называются **уровнями биологической безопасности (УББ)**. Выделяют 4 уровня, каждый из которых состоит из первичных и вторичных барьеров и особенностей микробиологических процедур. Первый уровень соответствует минимальному риску инфицирования; работа с микроорганизмами 4 класса патогенности требует соблюдения максимальных мер предосторожности.

**Уровень биологической безопасности 1.** Правила работы согласно технике безопасности, оборудование и помещение лаборатории пригодны для работы с известными штаммами микроорганизмов, с которыми случаи заболевания человека не зарегистрированы. Лаборатория не обязательно должна быть изолирована от помещений всего здания. Работа может проводиться на обычном лабораторном столе для стандартных микробиологических процедур. Специальное защитное оборудование не требуется и/или не используется. Персонал лаборатории проходит обычное обучение технике безопасности и находится под руководством начальника лаборатории, имеющего опыт работы в стандартной микробиологической лаборатории. Боксы биологической безопасности при работе с указанными штаммами микроорганизмов не обязательны.

**Уровень биологической безопасности 2.** Правила работы согласно технике безопасности, оборудование и помещение лаборатории пригодны для работы с широким спектром известных микроорганизмов, относящихся к группе умеренного риска, вызывающих заболевания человека средней степени тяжести.

*Основные отличия от уровня биологической опасности 1:*

- персонал лаборатории проходит специальное обучение по работе с патогенными микроорганизмами под руководством опытных специалистов;
- во время проведения работ доступ в лабораторию ограничен;
- рекомендуется осторожное обращение с острыми предметами;
- необходимы особые меры предосторожности при манипуляциях, в ходе которых могут образовываться аэрозоли и/или брызги. Рекомендуется использование физических барьеров защиты. Настоятельно рекомендуется проводить работу в боксах биологической безопасности класса I и класса II.

**Уровень биологической безопасности 3.** Правила работы согласно технике безопасности, оборудование и помещение лаборатории пригодны для работы с местными и экзотическими микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем и вызывающими тяжелые заболевания с возможным летальным исходом. Особое внимание должно быть уделено защите персонала (первичный и вторичный барьеры), а также защиты общества и окружающей среды. Необходимое требование: проведение работ в боксах биологической безопасности класса I и класса II.

**Уровень биологической безопасности 4.** Правила работы согласно технике без-

опасности, оборудование и помещение лаборатории приспособлены для работы с опасными и экзотическими штаммами микроорганизмов, представляющими высокий риск для здоровья и жизни человека. Заболевания передаются воздушно-капельным или неизвестными путями и не поддаются лечению; вакцины и лекарственные препараты отсутствуют. Персонал лаборатории проходит специальное и тщательное обучение по технике безопасной работы с особо опасными микроорганизмами и находится под руководством специалиста, имеющего опыт подобной работы. Вход в лабораторию строго ограничен. Лаборатория располагается в отдельном здании или в полностью изолированной части здания. Установлены специальные правила проведения работ в лаборатории. Наличие бокса биологической безопасности класса III строго обязательно.

### ***Практические рекомендации по биологической безопасности***

1. В лаборатории всегда необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с кровью и биологическими жидкостями организма, а также при использовании/хранении острых предметов, проводить обработку рук (универсальные меры предосторожности).

2. Не принимать пищу, не пить и не курить в лаборатории. Пищевые продукты нельзя хранить в холодильных камерах, используемых для хранения клинического материала.

3. Не проводить пипетирование ртом – использовать соответствующие механические устройства.

4. Дезинфицировать рабочие поверхности ежедневно и по необходимости (при случайном попадании биологического материала).

5. Использовать латексные перчатки подходящего размера.

6. Необходимо использовать лицевые щитки или маски и защитные очки в ситуациях, когда имеется высокая вероятность случайного контакта с кровью и биологическими жидкостями организма.

Помимо патогенности микроорганизмов и условий труда, при работе с ПБА в лабораториях необходимо учитывать дополнительные факторы:

- возможность образования аэрозоля;
- объем культуры патогена;
- концентрацию микроорганизмов и инфекционную дозу;
- естественные пути передачи инфекции;
- другие пути инфицирования, вызванные манипуляциями в лабораторных условиях (парентеральный, воздушно-капельный, оральный);
- потенциальные последствия инфицирования;
- стабильность агента в окружающей среде;
- тип выполняемой работы (in vivo, in vitro);
- работа с рекомбинантными микроорганизмами;
- любые генетические манипуляции с организмом, которые могут расширить ряд «хозяев» агента или изменить чувствительность агента к известным и эффективным схемам лечения;
- наличие на местах эффективных профилактических и терапевтических мер вмешательства.

Предотвращение распространения опасных биологических агентов возможно при строгом соблюдении стандартных правил работы в лаборатории и техники манипуля-

ций в сочетании с использованием первичных (безопасное оборудование) и вторичных барьеров (специальный дизайн оснащения лаборатории). Персонал лабораторий должен знать о потенциальной опасности инфекционных агентов/материалов. В соответствующих руководствах по лабораторной практике должны описываться мероприятия и процедуры, направленные на предотвращение риска развития у персонала лабораторных инфекций.

#### **7.4. Проблемы биобезопасности при промышленном использовании микроорганизмов**

Важным условием интенсивного развития промышленной биотехнологии является безопасность биотехнологических производств для человека и окружающей среды, которая достигается благодаря развитию методологии выявления возможных рисков, связанных с использованием микробных продуцентов и выбору оптимальных мер физической защиты.

Особенности проблемы обеспечения биобезопасности в биотехнологии связаны с условностью таксономической классификации микроорганизмов, разнообразием свойств штаммов, формально относящихся к одному таксономическому виду, а также естественным процессом расширения использования в промышленности высокоэффективных генно-инженерно-модифицированных микробных продуцентов.

Правительственные ведомства различных стран мира разрабатывают национальные правила для обеспечения биобезопасности в промышленной биотехнологии и сотрудничают в рамках ряда международных организаций для координации и выработки общих принципов этой деятельности.

Важным требованием к этой нормативной базе является то, что, обеспечивая биобезопасность производства, она не должна содержать лишних ограничений, мешающих использованию эффективных микробных продуцентов и сдерживающих развитие промышленной биотехнологии.

Постоянное совершенствование нормативной базы с целью оптимизации механизма выбора необходимых и достаточных мер для безопасного использования разнообразных штаммов микроорганизмов, максимальное использование для этой цели накапливаемых научных знаний и опыта работ, является основным принципом, положенным в основу современных подходов к обеспечению биобезопасности в странах с интенсивно развивающейся биотехнологией.

#### **7.5. Основные положения стандарта биологической безопасности**

ГОСТ 12.1.008-76 ССБТ (Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 10 марта 1976 г. № 578, дата введения установлена 01.01.1977 г. распространяется на работы с биологическими объектами, устанавливает общие требования безопасности и является основой для разработки комплекса государственных и отраслевых стандартов по биологической безопасности.

*Меры безопасности при работе с биологическими объектами должны обеспечивать предупреждение возникновения у работающих:*

- заболевания, состояния носительства, интоксикации, вызванных микроорганизмами: бактериями, вирусами, риккетсиями, спирохетами, грибами, актиномицетами, простейшими и продуктами их жизнедеятельности, и макроорганизмами: животными, растениями, человеком и продуктами их жизнедеятельности, а также культурами клеток и



тканей;

- сенсibilизации организма, вызванной микроорганизмами, перечисленными выше, и макроорганизмами: животными, растениями и продуктами их жизнедеятельности, а также культурами клеток и тканей;

- травм, вызванных макроорганизмами: растениями, животными, человеком.

*Для предупреждения вредного воздействия микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности требования безопасности следует предъявлять к следующим видам работ:*

- производству и контролю биологических признаков, основой или продуцентами которых являются микроорганизмы, биологические жидкости, ткани и органы, а также культуры клеток и тканей;

- использованию биологических препаратов для профилактики, лечения, диагностики и других целей в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве;

- мероприятиям по локализации и ликвидации очагов инфекционных болезней;

- использованию культур микроорганизмов в научно-исследовательских, учебных и практических учреждениях;

- работе в природных очагах инфекционных и инвазионных болезней (независимо от ее содержания);

- работе, требующей соприкосновения с почвой и водой - местами возможного обитания микроорганизмов (независимо от ее содержания);

- лечению и уходу за животными и людьми - больными и носителями;

- исследованию материалов от людей и животных, а также трупного материала в диагностических и научно-исследовательских целях.

*Для предупреждения опасного и вредного воздействия животных – домашних, диких и лабораторных – и продуктов их жизнедеятельности требования безопасности следует предъявлять к следующим видам работ:*

- обслуживанию животных в сельском хозяйстве и при производстве биологических препаратов, продуцентами которых они служат;

- обслуживанию животных в вивариях научно-исследовательских и практических учреждений;

- лечению животных;

- охотничьим и рыболовным промыслам;

- убою животных;

- переработке сырья животного происхождения;

- работе, требующей соприкосновения с почвой и водой, загрязненными выделениями животных;

- работе, требующей пребывания в местах обитания животных, представляющих производственную опасность;

- обслуживанию и дрессировке животных в зоологических садах и цирках.

*Для предупреждения опасного и вредного воздействия растений – культурных и дикорастущих – требования безопасности следует предъявлять к следующим видам работ:*

- выращиванию растений в сельском хозяйстве, лесном и городском хозяйствах;

- сбору и переработке растительного сырья;

- заготовке леса и лесохозяйственным работам;

- производству лекарственных препаратов и аллергенов из растений;

- производству кормов.

*Требования безопасности при работе с людьми следует предъявлять в следующих*

случаях:

- при работе в замкнутом пространстве в случае выделения в него продуктов жизнедеятельности человека;
- при соприкосновении с выделениями человека;
- при обслуживании и лечении психических больных.

*Безопасность труда при работе с биологическими объектами, представляющими производственную опасность, должна обеспечиваться:*

- производственным процессом;
- производственным оборудованием;
- средствами защиты;
- системой специальных профилактических мероприятий.

*Производственные процессы должны:*

- соответствовать требованиям ГОСТ 12.3.002-75;
- допускать возможность обеззараживания или обезвреживания территории, помещений, оборудования, транспортных средств, одежды и средств защиты применительно к специфике работы с данным биологическим объектом;
- допускать возможность контроля за условиями труда и соблюдением гигиенических требований;
- исключать неблагоприятное воздействие методов работы с биологическими объектами на работающих;
- исключать возникновение пожаров и взрывоопасных условий при выделении продуктов жизнедеятельности и распада биологических объектов;
- исключать возможность загрязнения внешней среды.

*Производственное оборудование должно:*

- соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.003-91;
- соответствовать психофизиологическим, санитарно-гигиеническим и эргономическим требованиям;
- обеспечивать возможность контроля за проведением измерений конкретных параметров биологической опасности в целях сопоставления их с соответствующими предельно допустимыми величинами;
- допускать возможность контроля за физиологическим состоянием и поведением биологического объекта;

*Средства защиты должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.011-89.*

*Система специальных профилактических мероприятий должна:*

- обеспечивать возможность создания у работающих с патогенными микроорганизмами специфического активного или пассивного иммунитета;
- обеспечивать нормирование продолжительности труда во вредных условиях;
- обеспечивать возможность повышения сопротивляемости организма (профилактическое питание).

*В стандартах по безопасности труда на каждый из перечисленных в пп. 3.1 - 3.4 видов работ с биологическими объектами должны быть установлены параметры биологической опасности и их допустимые значения, а также методы их измерения и контроля.*

## Вопросы для самоконтроля

- 1) Тенденции инфекционной заболеваемости в современном мире.
- 2) Эмерджентные инфекции.
- 3) Инфекционные биологические риски.
- 4) Основные принципы противобиологической защиты.
- 5) Классификационные группы средств системы биологического и экологического мониторинга окружающей среды в зависимости от назначения и принципа действия.
- 6) Обеспечение безопасности работ в микробиологических лабораториях.
- 7) Уровни биологической безопасности.
- 8) Практические рекомендации по биологической безопасности работ в микробиологической лаборатории.
- 9) Проблемы биобезопасности при промышленном использовании микроорганизмов.
- 10) Основные положения стандарта биологической безопасности.
- 11) Виды работ, к которым следует предъявлять требования безопасности для предупреждения вредного воздействия микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности.
- 12) Виды работ, к которым следует предъявлять требования безопасности для предупреждения опасного и вредного воздействия животных – домашних, диких и лабораторных – и продуктов их жизнедеятельности.
- 13) Виды работ, к которым следует предъявлять требования безопасности для предупреждения опасного и вредного воздействия растений – культурных и дикорастущих.
- 14) Случаи, при которых следует соблюдать требования безопасности при работе с людьми.
- 15) Безопасность труда при работе с биологическими объектами, представляющими производственную опасность.
- 16) Требования безопасности к производственным процессам.
- 17) Требования безопасности к производственному оборудованию.
- 18) Система специальных профилактических мероприятий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
2. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. Иммуно- и нанобиотехнология / Э.Г. Деева [и др.]. – Спб.: «Проспект Науки», 2008. – 192 с. – ISBN 978-5-903090-16-7
5. Мушкaмбaрoв, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкaмбaрoв, С.Л. Кузнецoв. – М.: Мeдиnфoрмaгeнcтвo, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6

### Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. Закревский, В.В. Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище : практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору / В.В. Закрев-

ский. – СПб. : ИОРД, 2004. – 275 с. – ISBN 5-901065-81-6

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. *Сазыкин, Ю.О.* Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

6. *Сассон, А.* Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.

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

8. Журнал «Биотехнология».

9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)

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

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

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

## **БЕЗОПАСНОСТЬ РАБОТЫ С КОЛЛЕКЦИОННЫМИ, ПРОИЗВОДСТВЕННЫМИ И ТЕСТ-ШТАММАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ**

### **8.1. Требования к учету и хранению бактерий в коллекции**

Требования к порядку учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности (патогенные биологические агенты – ПБА) устанавливают СП 1.2.036-95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности, утвержденные постановлением Правительства Российской Федерации от 05.06.94 № 625.

#### ***Основные положения СП 1.2.036-95***

В подразделениях, изготавливающих вакцины, обслуживающих водопроводы, пищевые предприятия, а также предприятия, производящие продукцию медицинского назначения (антибиотики, лекарственные, косметические средства и другие коммерческие препараты), запрещается иметь ПБА I - IV групп и проводить микробиологические (бактериологические, вирусологические, микологические и др.) исследования, связанные с изучением первично выделенных культур, подозрительных на наличие возбудителей I - IV групп.

Производственным подразделениям предприятий, контролирующим готовую продукцию, разрешается иметь только коллекцию типовых культур, предусмотренных нормативно-технической документацией.

В организациях, систематически работающих с ПБА I - IV групп, разрешается иметь коллекции типовых, авторских и депонированных штаммов для научной работы, производства и диагностических целей.

Для централизованного учета, хранения и депонирования штаммов микроорганизмов, имеющихся в организациях на территории России, министерства и ведомства определяют научно-исследовательские институты, на базе которых организуются специализированные коллекции с информационными функциями.

О выделении всех ПБА I - II групп и атипичных ПБА III - IV групп необходимо информировать соответствующие специализированные коллекции и по согласованию с их руководителями передавать эти ПБА в коллекции.

Производственные и эталонные ПБА I - IV групп разрешается получать только в специализированных коллекциях.

#### ***Требования к учету и хранению ПБА***

Подразделения, проводящие диагностические исследования по выделению ПБА I - IV групп или работающие с ними, должны вести учет движения и хранения ПБА по формам: журнал регистрации патогенных биологических агентов, поступивших для исследования (идентификации) и хранения; журнал учета выделенных штаммов микроорганизмов; журнал учета движения патогенных биологических агентов; журнал учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции; журнал обеззараживания патогенных биологических агентов.

Все коллекции должны вести учет ПБА I-IV групп по следующим формам: журнал регистрации патогенных биологических агентов, поступивших для исследования

(идентификации) и хранения; журнал учета движения патогенных биологических агентов; инвентарный журнал коллекционных патогенных биологических агентов; журнал выдачи патогенных биологических агентов; карта индивидуального учета коллекционного патогенного биологического агента N; журнал учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции; журнал лиофилизации патогенных биологических агентов; журнал обеззараживания патогенных биологических агентов.

Штаммы, используемые для диагностических целей, а также вакцинные и производственные учитывают как коллекционные.

Емкости, содержащие ПБА, должны иметь четкие, несмываемые надписи или прочно наклеенные этикетки с обозначением названия ПБА, номера штамма и даты лиофилизации (пересева).

На емкостях с токсинами должна быть дополнительная маркировка красным цветом правого нижнего угла этикетки.

ПБА I - IV групп в коллекциях должны храниться в лиофилизированном или замороженном состоянии, на плотных или жидких питательных средах, а также в виде суспензий органов и тканей в консерванте.

В подразделениях научно-исследовательских институтов допускается хранение в лиофилизированном состоянии ПБА III - IV групп (бактерии и риккетсии), II - IV групп (вирусы), а также хранение авирулентных, комиссионно проверенных ПБА I - II групп, список которых утверждает руководитель организации.

ПБА следует хранить в холодильнике или несгораемом шкафу (сейфе) отдельно по группам. Совместное содержание ПБА различных групп допускается при условии хранения их в отдельных небьющихся емкостях с закрывающейся крышкой. Емкости опечатывают, снаружи или внутри их помещают список с перечнем и количеством хранящихся ПБА.

ПБА, служащие основой для приготовления вакцин, в производственных подразделениях хранят в отдельных помещениях. Вакцинные штаммы в коллекциях – в отдельном холодильнике (шкафу), где отсутствуют другие ПБА; в исследовательских и диагностических подразделениях – в отдельных емкостях.

## **8.2. Правила транспортировки микроорганизмов**

Транспортирование ПБА I - IV групп между организациями осуществляется почтовой связью или нарочным(и).

ПБА I - II групп пересылают спецсвязью или с двумя нарочными, знакомыми с требованиями биологической безопасности, причем один из них должен иметь медицинское (биологическое, ветеринарное) образование и быть допущен к работе с ПБА I - II групп.

ПБА III - IV групп разрешается пересылать обычной почтовой посылкой или с одним нарочным.

При транспортировании ПБА I - IV групп в целях исключения всех видов досмотра и контроля нарочному должна быть выдана справка.

На содержимое упаковки с ПБА I - IV групп составляют сопроводительное письмо на официальном бланке организации. Для ПБА I - II групп дополнительно составляют акт упаковки в двух экземплярах. Первые экземпляры указанных документов помещают в упаковку с ПБА. Копии документов остаются у отправителя. Организация, получившая ПБА I-II групп, должна составить акт вскрытия упаковки и вместе с письмом, подтверждающим получение ПБА, направить его в организацию их выдавшую.

Организация-отправитель обязана сообщить любым видом срочной связи организацией-получателем дату и вид транспорта, которым отправлен ПБА.

ПБА I - IV групп передают в лиофилизированном состоянии или на плотных питательных средах. Передача токсинов, вирусов (органов, тканей и их суспензий, содержащих эти ПБА) допускается в консервирующей жидкости или в замороженном состоянии.

Транспортирование ПБА осуществляется в герметически закрытых емкостях. Под *герметически закрытыми емкостями* следует понимать запаянные ампулы, пробирки, завальцованные флаконы, запечатанные трубки из толстого стекла или пластического материала, а также пробирки, закрытые пробкой и герметизированные различными пластификаторами (парафин и др.).

Емкости с ПБА заворачивают в лигнин или гигроскопическую вату, помещают в металлический или пластмассовый (только для III - IV групп) плотно закрывающийся или завинчивающийся пенал. Упаковка емкостей с ПБА в пенале должна исключать возможность их перемещения во избежание нарушения целостности при транспортировании, а поглощающий материал должен быть в достаточном количестве для сорбции всей жидкости в случае повреждения упаковки.

Пеналы с упакованными в них емкостями, содержащими ПБА I - IV групп, обертывают бумагой (обшивают материалом), ошнуровывают и опечатывают сургучной печатью.

Для пересылки объектов почтой или спецсвязью упакованные пеналы дополнительно обертывают ватой и укладывают в прочные деревянные посылочные ящики так, чтобы исключить возможность их перемещения внутри ящика. Ящик с ПБА I - II групп обшивают тканью и обязательно опечатывают сургучной печатью или пломбируют.

На адресной стороне ящика посылки должен быть особый знак (ярлык с отметкой) "Опасно! Не открывать во время перевозки".

Перевозка живых животных и членистоногих, зараженных ПБА I - IV групп, категорически запрещается.

В случае возникновения при транспортировании ПБА I - IV групп аварий, катастроф, утраты и хищения посылок необходимо сообщать в органы государственного санитарно-эпидемиологического надзора, органы ФСБ, МВД, для принятия мер по охране места происшествия, ликвидации последствий, организации розыска потерянного или похищенного. Об этом факте информируют организации-отправителя и организации-получателя ПБА.

### **8.3. Требования к помещениям**

Помещения для хранения коллекции микроорганизмов и работа с ПБА III - IV групп разделяются на "заразную" зону, где осуществляются манипуляции с ПБА III - IV групп и их хранение, и "чистую" зону, где не проводят работы с микроорганизмами и их хранение. На границе "чистой" и "заразной" зон должен располагаться санитарный пропускник.

*В "чистой" зоне корпуса должны располагаться следующие помещения:*

- гардероб для верхней одежды;
- административные помещения;
- помещение отдыха и приема пищи;
- помещение для работы с документами и литературой;
- помещение подготовки питательных сред, реактивов и посуды для вирусологиче-

ских исследований;

- помещение подготовки питательных сред, реактивов и посуды для бактериологических исследований;
- помещение работы с культурами тканей;
- склад хранения реактивов, посуды и упаковочных материалов;
- помещение приготовления фильтрованной и дистиллированной воды;
- насосная станция пожаротушения,
- помещения для размещения оборудования приточной, вытяжной вентиляции и помещения HEPA- фильтров.
- помещение для стирки, сушки, глажения и хранения спецодежды сотрудников;
- помещение для хранения уборочного инвентаря «чистой» зоны;
- туалет.

*В "заразной" зоне должны размещаться:*

- помещение для приема (отпуска) и регистрации поступающих (отправляемых) материалов;
- отделение хранения производственных и музейных штаммов вирусов;
- отделение хранения производственных и музейных штаммов бактерий;
- отделение хранения производственных и музейных штаммов грибов-дерматофитов;
- отделение карантинного хранения вновь поступивших материалов и «экзотических» штаммов микроорганизмов;
- отделение для проведения вирусологических исследований;
- отделение для проведения бактериологических исследований;
- отделение для проведения исследований с грибами-дерматофитами;
- отделение для проведения серологических исследований;
- помещение для люминесцентной микроскопии;
- помещения для ПЦР-диагностики;
- отделение лиофилизации;
- помещение для обеззараживания (автоклавная);
- помещение для хранения уборочного инвентаря «заразной» зоны;
- туалет;
- отделение обеззараживания возможно инфицированных канализационных стоков.

*Работы, проводимые в помещениях «заразной» зоны относятся ко 2 уровню биологической безопасности, который характеризуется следующими основными положениями:*

- все работы в помещениях проводятся согласно, утверждаемым «Правилам техники безопасности»;
- оборудование и помещения лабораторий пригодны для работы с широким спектром известных микроорганизмов, относящихся к группе умеренного риска, вызывающих заболевания человека средней степени тяжести;
- персонал лаборатории проходит специальное обучение по работе с патогенными микроорганизмами под руководством опытных специалистов;
- во время проведения работ доступ в лабораторию ограничен;
- рекомендуется осторожное обращение с острыми предметами;
- необходимы особые меры предосторожности при манипуляциях, в ходе которых могут образовываться аэрозоли и/или брызги. Рекомендуется использование физиче-



ских барьеров защиты.

Для работы с ПБА III - IV групп должны применяться боксы биологической безопасности II класса. Все работы в боксах биологической безопасности проводят на поддонах с салфетками, смоченными дезинфицирующим раствором.

Работы, связанные с высоким риском образования аэрозоля (центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, обработка ультразвуком и др.) при невозможности их осуществления в боксах биологической безопасности должны проводиться в отдельных боксированных помещениях.

*Боксы биологической безопасности должны проверяться на защитную эффективность:*

- после монтажа и подготовки к использованию;
- не реже одного раза в год при наличии фильтров предварительной очистки воздуха от крупнодисперсных частиц;
- не реже одного раза в полугодие при отсутствии фильтров предварительной очистки воздуха от крупнодисперсных частиц;
- после перемещения или ремонта бокса.

При проверке должна определяться эффективность работы фильтров очистки воздуха, скорость воздушного потока в рабочем проеме бокса.

**Требования к архитектурно-планировочным и конструктивным решениям.** Для всех помещений, предназначенных для работы с ПБА III - IV групп должны быть установлены зоны чистоты В, С, D.

Для соблюдения режима стерильности все производственные помещения после уборки, а также в процессе текущей эксплуатации должны подлежать облучению стационарными и передвижными бактерицидными облучателями. Технологическое оборудование, мебель, инвентарь, отделка стен и потолков должны иметь покрытие, обеспечивающее возможность проведения регулярной влажной уборки и дезинфекции.

Полы помещений, где проводятся работы с ПБА, должны быть герметичными, устойчивыми к истиранию и обработке моющими и дезинфицирующими средствами, выполнены с учетом возможности удержания аварийных утечек биоматериала. В помещениях лабораторий должны применяться полы из следующих материалов: полимерные наливные композиции, полимерные рулонные материалы (антистатический линолеум).

Стыки между потолочными и стеновыми ограждающими конструкциями, стенами и полами должны быть выполнены скругленными. Все швы должны быть загерметизированы специальным невысыхающим герметиком.

Передаточные окна (шлюзы) предназначены для передачи материалов и инструментов между помещениями должны быть устроены без перетока воздуха. Должна быть предусмотрена звуковая и световая сигнализация (при необходимости и блокировка открывания) для исключения одновременного открывания двух дверей в смежные помещения. При необходимости должны быть предусмотрены встроенные устройства бактерицидной обработки внутреннего пространства ультрафиолетовым облучением. Размеры переходных тамбуров, лабораторных помещений, передаточных окон определяются технологией работ.

Тамбуры (шлюзы) должны обеспечивать перемещение персонала, материалов, между помещениями с разными классами чистоты без внесения изменений в концентрацию аэрозольных частиц в этих помещениях. Должна быть предусмотрена звуковая и световая сигнализация (при необходимости и механическая блокировка открывания) для ис-

ключения одновременного открывания двух дверей в смежные помещения.

Все помещения, предназначенные для работы с ПБА III - IV групп должны быть оборудованы, автономной приточно-вытяжной вентиляцией без рециркуляции воздуха. Количество автономных приточно-вытяжных систем должно быть определено при разработке технологического раздела проектной документации, исходя из требований технологии и характеристик используемого технологического оборудования, необходимого температурно-влажностного режима и чистоте воздуха в помещениях.

Вентиляционными системами в автоматическом режиме должны обеспечиваться каскады отрицательных давлений от наиболее потенциально контаминированных зон в наименее потенциально контаминированные зоны, предусмотреть перепад давления в соответствующих чистых зонах не менее 10 Па. Должна быть предусмотрена автоматическая балансировка объемов поступающего и удаляемого воздуха с целью сохранения каскада давлений и предотвращения чрезмерного повышения давления в случае сбоя вытяжных вентиляторов и создания обратного движения направленного потока воздуха.

В приточных и вытяжных системах лабораторных помещений, предназначенных для работы с ПБА III - IV групп, должны быть предусмотрены резервные вентиляторы с автоматическим включением в случае выхода из строя или неправильной работы основных вентиляторов. Вентиляционные системы должны иметь средства контроля и тревожную сигнализацию для выявления неправильной работы или отклонения от проектных параметров.

Подача наружного приточного воздуха, исходя из требований технологии, должна осуществляться в помещения лаборатории, предназначенные для работы с ПБА III - IV групп, через двухступенчатую или трехступенчатую систему фильтрации. Кратность воздухообмена для чистых зон и типы фильтров установить при разработке проектной документации. Воздух, подаваемый в чистые помещения, должен проходить по схеме сверху-вниз через решетки, устанавливаемые в верхней части помещений, с фильтром. Удаление воздуха – из нижней части помещения через решетки расположенные у пола, оснащенные фильтрами тонкой очистки (HEPA-фильтры), и через местные отсосы ламинарных боксов или вытяжных шкафов.

Выходящий воздух из помещений лабораторий должен подвергаться двум этапам фильтрации на HEPA-фильтрах. Корпуса вытяжных фильтров должны быть оснащены датчиками для непрерывного мониторинга состояния вытяжных HEPA-фильтров с выводом информации в систему диспетчеризации, а также обеспечивать проведение биотестов на эффективность и проскок. Корпуса вытяжных HEPA-фильтров должны быть оборудованы средствами изоляции и деконтаминации. Конструкция корпусов фильтров должна предусматривать извлечение отработанных HEPA-фильтров в газонепроницаемый контейнер, по системе в пакет – из пакета, для последующей деконтаминации и уничтожения.

Воздуховоды вентсистем изготавливаются из тонколистовой оцинкованной стали. Воздуховоды систем кондиционирования после фильтров тонкой очистки до воздухо-распределителей и воздуховоды для местных отсосов в пределах чистых зон – из нержавеющей стали. Воздухораспределители принять из материалов допускающих обработку дезрастворами, в воздуховодах предусмотреть лючки для прочистки.

### **Вопросы для самоконтроля**

- 1) Требования к учету и хранению бактерий в коллекции.

- 2) Основные положения СП 1.2.036-95.
- 3) Требования к учету и хранению патогенных биологических агентов (ПБА).
- 4) Правила транспортировки микроорганизмов.
- 5) Требования к помещениям для хранения коллекции микроорганизмов и работы с ПБА.
- 6) «Чистая» зона.
- 7) «Заразная» зона.
- 8) Основные положения работ, проводимых в помещениях «заразной» зоны.
- 9) Требования к архитектурно-планировочным и конструктивным решениям.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
2. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
4. Иммуно- и нанобиотехнология / Э.Г. Деева [и др.]. – Спб.: «Проспект Науки», 2008. – 192 с. – ISBN 978-5-903090-16-7
5. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6

### Дополнительная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Глазко, В.И. Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
3. Закревский, В.В. Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище : практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору / В.В. Закревский. – СПб. : ИОРД, 2004. – 275 с. – ISBN 5-901065-81-6
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. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
6. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
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
8. Журнал «Биотехнология».
9. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
10. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
11. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
12. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)

## ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

### 9.1. Утилизация и уничтожение отходов производства

Отходами биотехнологического производства могут быть клетки (ткани) и культуральные жидкости после извлечения из них нужных метаболитов. Нет полной информации о количестве отходов всех биопроизводств в мире. Например, на одну тонну лимонной кислоты образуется 150-200 кг сухого мицелия.

Отходы биотехнологических производств относятся к типу разлагающихся в природных условиях под действием различных факторов (биологических-минерализация с участием микроорганизмов, химических – окисление, физико-химических – благодаря комплексному воздействию, например, лучистой энергии, химических веществ).

Отходы биотехнологических производств подразделяются на твердые и жидкие.

**Плотные отходы** в биотехнологических производствах представляют собой микробную массу, отделяемую от культурального фильтра: шламы; растительную биомассу, после экстракции из нее действующих веществ; некоторые тканевые культуры млекопитающих; осадки сточных вод (ил).

Подсчитано, что в коммунальных очистных сооружениях сточные воды от одного горожанина образуют за год около 500 литров ила.

В пивоварении плотными отходами являются дрожжевые клетки (0,40 кг на 1 гл пива), солодовая и хмельная дробина, белковый осадок из сепараторов. За счет того, что белковый осадок, хмельная дробина содержит горечи, их не могут использовать в качестве добавок к кормам животных, поэтому их либо сжигают либо передают на биологическое обезвреживание.

В спиртовом производстве отходом является барда, состав которой зависит от качества используемого сырья (картофель, зерно). Высушенная барда используется в качестве добавок к корму.

Количество плотных отходов действует на выбор метода их обеззараживания. Так, патогенные микробы должны быть обезврежены полностью. Эффективный способ - сжигание. Если отходом является биомасса клеток стрептомицетов, их достаточно убить нагревом, далее их можно уже использовать в качестве добавок к кормам, в качестве удобрений. Но здесь необходимо исключить их сенсibiliзирующее действие. В аэробных очистных сооружениях, где происходит обезвреживание отходов, лимитирующими факторами выступают качество и площадь биопленки, состоящей из микромакрофлоры и фауны. При этом необходимо убедиться, что привносимые плотные отходы, которые богаты органическими веществами, не приведут к ухудшению работы аэротенков.

**Жидкие отходы** в биотехнологических производствах достаточно разнообразны по своему составу. Это объясняется неполным использованием биообъектами компонентов, входящих в состав питательных сред; присутствием растворителей, используемых для экстракции конечных продуктов; наличием веществ, секретируемых клетками. Жидкие отходы дрожжевых заводов, где производят дрожжи на мелассном сусле, содержат органические и минеральные вещества: этанол, углеводы, общий азот, зольные элементы.

Отходы, образующиеся от 1000 т мелассы, соответствуют бытовым стокам города с населением около 0,5 млн. жителей. Подобные жидкие отходы подвергают микробио-

логической обработке. Сточные воды отдельных предприятий неравноценны. Одни могут быть названы условно чистыми, поскольку они почти не отличаются от потребляемой в производствах природной воды (конденсаты, вода из теплообменников). Другие воды являются загрязненными неорганическими и органическими примесями, которые попадают от сырья, загрязненного при транспортировке; от оборудования. Отличительной особенностью биотехнологических процессов, основанных на выделении метаболитов из культуральных жидкостей, является неравновесное соотношение целевого продукта и жидкости. В подобных производствах количество жидких отходов больше, чем плотных.

**Газообразные отходы** в процессах биологической технологии немногочисленны в ассортименте. Энергетическим субстратом для биообъектов является углеводы. В аэробных и анаэробных условиях из них образуется диоксид углерода. Выделяющийся диоксид углерода улавливается и утилизируется в пищевой промышленности в качестве хладагента. "Отработанный воздух" биотехнологических процессов не должен поступать в атмосферу без очистки и обезвреживания. "Отработанный воздух" представляет собой высокодисперсный аэрозоль, в котором дисперсной фазой оказываются капельки жидкости и микроорганизмы. Они легко переносятся воздушными потоками и на большие расстояния и не исключено неблагоприятное воздействие на людей. "Отработанный воздух" должен быть термически обработан и только после этого подвергается фильтрационной очистке.

## 9.2. Индикация генетической опасности факторов внешней среды

Исследования генетических аспектов антропогенного загрязнения биосферы в нашей стране ведутся с середины 70-х годов. За этот период опубликовано много работ, отражающих генетические изменения в природных популяциях и совершенствование методической базы исследований. Однако ни целостной системы, ни стандартизированных методов исследования природных популяций растений и животных пока не создано. Генетический мониторинг популяций различных видов диких животных и растений должен способствовать дальнейшему развитию идеи интеграции гигиенического и экологического нормирования техногенного загрязнения окружающей среды.

**Тест-системы и методы лабораторного анализа мутагенов.** При генетическом мониторинге существует постоянная необходимость тестирования мутагенности образцов газов, аэрозолей, воды и почвы из контролируемых рабочих зон предприятий и природных экосистем. В настоящее время в исследовательской практике используют более 200 различных генетических тест-систем. Для генетического тестирования могут быть использованы любые разработанные к настоящему времени методы исследования мутагенеза, однако некоторые из них более широко распространены. При скрининге мутагенов очень часто используют бактериальные тесты на *Salmonella typhimurium*, *E. coli* и некоторых других видах бактерий, тесты на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*. Широко распространены эмбриональный тест на резус-видке Таля – *Arabidopsis thaliana* и цитогенетические исследования на *Tradescantia*. Классическим объектом в исследованиях мутагенеза является *Drosophila melanogaster*. Анализ аберраций хромосом на стадиях анафазы и метафазы позволяют использовать практически любые виды растений и животных, кариотип которых не содержит большого количества хромосом. Поэтому нецелесообразно перечислять все виды растений и животных, которые были использованы для анализа мутагенности химических и физических факторов. Отметим лишь наиболее часто используемые группы видов: кре-

пис, ячмень, луки и бобовые различных видов – из растений; хомяки, мыши и крысы – из животных. Развитие в 70-х годах различных методов дифференциальной окраски хромосом и хроматид позволили повысить чувствительность цитогенетического метода исследования мутагенов. Введение в практику микроядерного теста на млекопитающих, а затем и других типах организмов позволило значительно облегчить упростить предварительный анализ мутагенов. Большое значение для исследования мутагенеза имели методы исследования в отдельных локусах генов и электрофоретические методы анализа изоферментов и других белков. В 80-х годах стали использовать молекулярные методы исследования мутагенеза.

**Индикаторные виды организмов для анализа генетических последствий техногенного загрязнения экосистем.** В настоящее время существует несколько сотен тест-систем для анализа мутагенности факторов. Каждая из тест-систем имеет определённые преимущества и недостатки. Кроме того, использование некоторых из тестерных видов организмов ограничено рубежами ареалов или биотопическими особенностями вида. В связи с этим вряд ли будет определён жёсткий список видов, используемый для генетического мониторинга во всех природно-климатических зонах.

Большой объём исследований выполнен при анализе природных популяций *E. coli*. Для целей генетического мониторинга с успехом использовали зелёные водоросли, природные популяции арабидопсиса, хвойных деревьев, мышиного горошка, дрозофилы, комаров, рыб, амфибий, птиц, грызунов.

### 9.3. Методы контроля мутагенной/канцерогенной активности различных веществ

По характеру воздействия на организм человека химические вещества подразделяются на:

**Общетоксические химические вещества** (углеводороды, спирты, анилин, сероводород, синильная кислота и ее соли, соли ртути, хлорированные углеводороды, оксид углерода), которые вызывают расстройства нервной системы, мышечные судороги, нарушают структуру ферментов, влияют на кроветворные органы, взаимодействуют с гемоглобином.

**Раздражающие вещества** (хлор, аммиак, диоксид серы, туманы кислот, оксиды азота и др.) воздействуют на слизистые оболочки, верхние и глубокие дыхательные пути.

**Сенсибилизирующие вещества** (органические азокрасители, диметиламиноазобензол и другие антибиотики) повышают чувствительность организма к химическим веществам, а в производственных условиях приводят к аллергическим заболеваниям

**Канцерогенные вещества** (бенз(а)пирен, асбест, нитроазосоединения, ароматические амины и др.) вызывают развитие всех раковых заболеваний. Этот процесс может быть отдален от момента воздействия вещества на годы и даже десятилетия.

**Мутагенные вещества** (этиленамин, окись этилена, хлорированные углеводороды, соединения свинца и ртути и др.) оказывают воздействие на неполовые (соматические) клетки, входящие в состав всех органов и тканей человека, а также на половые клетки (гаметы). Воздействие мутагенных веществ на соматические клетки вызывают изменения в генотипе человека, контактирующего с этими веществами. Они обнаруживаются в отдаленном периоде жизни и проявляются в преждевременном старении, повышении общей заболеваемости, злокачественных новообразований. При воздействии на половые клетки мутагенное влияние сказывается на последующее поколение, иногда в очень отдаленные сроки.

*Химические вещества, влияющие на репродуктивную функцию человека* (борная кислота, аммиак, многие химические вещества в больших количествах), вызывают возникновение врожденных пороков развития и отклонений от нормальной структуры у потомства, влияют на развитие плода в матке, послеродовое развитие и здоровье потомства.

Три последних вида вредных веществ (мутагенные, канцерогенные, и влияющие на репродуктивную способность) характеризуются отдаленными последствиями их влияния на организм. Их действие проявляется не в период воздействия и не сразу после его окончания, а в отдаленные периоды, спустя годы и даже десятилетия.

### Вопросы для самоконтроля

- 1) Утилизация и уничтожение отходов производства.
- 2) Плотные отходы биотехнологических производств.
- 3) Жидкие отходы биотехнологических производств.
- 4) Газообразные отходы биотехнологических производств.
- 5) Индикация генетической опасности факторов внешней среды.
- 6) Тест-системы и методы лабораторного анализа мутагенов.
- 7) Индикаторные виды организмов для анализа генетических последствий техногенного загрязнения экосистем.
- 8) Классификация химических веществ по характеру воздействия на организм человека.
- 9) Методы контроля мутагенной/канцерогенной активности различных веществ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
2. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
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. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. - М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0

#### Дополнительная

1. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
2. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхнолoгiя», 2005. – 430 с.
3. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – 600 с.– ISBN 5-02-026027-4
4. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
5. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
7. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.

8. *Щелкунов, С.Н.* Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Наука, 2004. – 496 с. – ISBN: 5-94087-098-8
9. Журнал «Биотехнология».
10. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)
11. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
12. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
13. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)



## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
2. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин и др.; под ред. А.П. Ермишина. – Минск: «Тэхноложыя», 2005. – 430 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение./ И. Хиггинс и др.; под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 482 с.
4. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина и др. ; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: «Оникс», 2009. – 496 с. – ISBN 978-5-488-02173
5. Биотехнология: учебное пособие для вузов, в 8 кн., под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М., 1987.
6. *Бирюков, В.В.* Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с. – ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»); ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»)
7. 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
8. *Глазко, В.И.* Толковый словарь терминов по молекулярной биологии, генетике, селекции, биоинформатике (в двух томах) / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – М.: Медицина, 2008. – 640 с. – ISBN 978-5-94628-255-0. – ISBN 978-5-94628-269-7 (т. 1)
9. *Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с. – ISBN: 5-03-003328-9
10. *Гуттман, Б.* Генетика / Б. Гуттман, Э. Гриффитс, Д. Сузуки, Т. Куллис. – М.: ФАИР-пресс, 2004. – 520 с. – ISBN 5-8183-0816-2; ISBN 1-85168-304-6
11. *Донченко, Л.В.* Безопасность пищевой продукции / Л.В. Донченко, В.Д. Надывка. – М.: Пищепромиздат, 2001. – 528 с.
12. *Елинов, Н.П.* Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – СПб.: Наука, 1995. – 600 с.– ISBN 5-02-026027-4
13. *Закревский, В.В.* Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище : практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору / В.В. Закревский. – СПб. : ИОРД, 2004. – 275 с. – ISBN 5-901065-81-6
14. Иммуно- и нанобиотехнология / Э.Г. Деева [и др.]. – Спб.: «Перспектив Науки», 2008. – 192 с. – ISBN 978-5-903090-16-7
15. *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
16. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
17. *Королев, А.А.* Гигиена питания : учебник / А.А. Королев. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: Академия, 2007. – 528 с. – ISBN 978-5-7695-3593-2
18. *Мушкамбаров, Н.Н.* Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
19. *Патрушев, Л.И.* Искусственные генетические системы / Л.И. Патрушев. – М.: Наука, 2004. – 530 с. – ISBN 5-02-032893-6
20. *Патрушев, Л.И.* Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. – М.: Наука, 2000. – 830 с. – ISBN: 5-02-001890-2
21. *Сазыкин, Ю.О.* Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-5506-0
22. *Сассон, А.* Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 415 с.
23. Сельскохозяйственная биотехнология / Шевелуха В.С. и др. – М.: Высшая школа, 2003. – 427 с. – ISBN: 5-06-004264-2
24. Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования. Дата введения 1977-01-01 // Межгосударственный стандарт. ГОСТ 12.1.008-76. Группа

T58. Утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 10 марта 1976 года № 578. Переиздание. Сентябрь 1999 г.

25. *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

26. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Институт биохимии им. Н.А. Баха РАН. – М., 2011. – 323 с.

27. *Щелкунов, С.Н.* Генетическая инженерия. Учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Наука, 2004. – 496 с. – ISBN: 5-94087-098-8

28. Журнал «Биотехнология».

29. Биотехнологический портал Bio-X (ссылка доступа - <http://bio-x.ru>)

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

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

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

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
<b>Лекция 1. Введение в проблему.....</b>	<b>4</b>
1.1. Термины и понятия биобезопасности.....	4
1.2. Нормативная база для обеспечения биобезопасности биотехнологических производств.....	4
1.3. Национальная программа химической и биологической безопасности Российской Федерации.....	6
Вопросы для самоконтроля.....	7
Список литературы.....	7
<b>Лекция 2. Основы молекулярной генетики – базиса современной биотехнологии.....</b>	<b>9</b>
2.1. Особенности организации генетического материала у микроорганизмов..	9
2.2. Репликация ДНК.....	10
2.3. Процесс транскрипции.....	11
2.4. Свойства генетического кода.....	11
2.5. Биохимические компоненты системы биосинтеза белка. Стадии трансляции.....	12
Вопросы для самоконтроля.....	14
Список литературы.....	14
<b>Лекция 3. Научно-методические основы создания и совершенствования штаммов-продуцентов для промышленности.....</b>	<b>16</b>
3.1. Технология создания гибридных молекул ДНК.....	16
3.2. Свойства плазмид.....	17
3.3. Механизмы автономной репликации плазмидных ДНК.....	18
3.4. Критерии классификации плазмид.....	18
Вопросы для самоконтроля.....	19
Список литературы.....	20
<b>Лекция 4. Инструментарий генно-инженерных технологий.....</b>	<b>21</b>
4.1. Фрагментация и фракционирование ДНК.....	21
4.2. Энзимология молекулярного клонирования.....	21
4.3. Основные требования, предъявляемые к вектору.....	21
4.4. Типы векторов.....	22
4.5. Методы введения гибридных ДНК в клетку.....	23
4.6. Экспрессия клонированных генов.....	24
4.7. Селекция рекомбинантов.....	25
Вопросы для самоконтроля.....	26
Список литературы.....	26
<b>Лекция 5. Система безопасности в области генно-инженерной деятельности (ГИД).....</b>	<b>27</b>
5.1. Возможные аспекты биологической опасности и экологические риски генетически модифицированных организмов.....	27
5.2. Функции межведомственной комиссии по проблемам ГИД.....	28
5.3. Факторы риска.....	28
5.4. Уровни риска генно-инженерных работ – базовые принципы и методология оценки.....	29
5.5. Понятия биологической защиты работников, населения, окружающей	

среды.....	30
Вопросы для самоконтроля.....	30
Список литературы.....	30
<b>Лекция 6. Современные микробные факторы биологической опасности, связанные с биотехнологическими процессами.....</b>	<b>32</b>
6.1. Прионы.....	32
6.2. Биопленки.....	33
6.3. Системы quorum sensing.....	34
Вопросы для самоконтроля.....	34
Список литературы.....	34
<b>Лекция 7. Осуществление безопасности биотехнологических процессов производства диагностических и иммунобиологических препаратов.....</b>	<b>36</b>
7.1. Тенденции инфекционной заболеваемости в современном мире. Эмерджентные инфекции.....	36
7.2. Создание более совершенных средств обнаружения и защиты от биологических поражающих агентов.....	37
7.3. Обеспечение безопасности работ в микробиологических лабораториях.....	37
7.4. Проблемы биобезопасности при промышленном использовании микроорганизмов.....	40
7.5. Основные положения стандарта биологической безопасности.....	40
Вопросы для самоконтроля.....	43
Список литературы.....	43
<b>Лекция 8. Безопасность работы с коллекционными, производственными и тест-штаммами микроорганизмов, используемых в биотехнологических процессах.....</b>	<b>45</b>
8.1. Требования к учету и хранению бактерий в коллекции.....	45
8.2. Правила транспортировки микроорганизмов.....	46
8.3. Требования к помещениям.....	47
Вопросы для самоконтроля.....	51
Список литературы.....	51
<b>Лекция 9. Экологические аспекты биотехнологических производств.....</b>	<b>52</b>
9.1. Утилизация и уничтожение отходов производства.....	52
9.2. Индикация генетической опасности факторов внешней среды.....	53
9.3. Методы контроля мутагенной/канцерогенной активности различных веществ.....	54
Вопросы для самоконтроля.....	54
Список литературы.....	54
Библиографический список.....	57
Содержание.....	59