

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет  
имени К. И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

Мұхтарова Әнел Саматқызы

Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре *in vitro*

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

Специальность 6В05101 – Биотехнология

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет  
имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

**ДОПУЩЕНА К ЗАЩИТЕ**



**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

На тему: «Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре *in vitro*»

по специальности 6В05101 – Биотехнология

Выполнила

Мұхтарова Әнел Саматқызы

Рецензент  
кандидат биологических наук,  
асс. профессор

Лесова Ж.Т.  
«29» мая 2023 г.

Научный руководитель,  
кандидат с.-х. наук,  
асс. профессор

Каташева А.Ч.  
«29» мая 2023 г.

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет  
имени К.И.Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова  
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

6B05101 - Биотехнология

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующий кафедрой  
«Химическая и  
биохимическая инженерия»  
доктор Ph.D.  
А.А. Амитова  
*А.А. Амитова* 2023 г.



**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение дипломной работы**

Обучающемуся Мұхтаровой Әнел Саматқызы

Тема: Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре *in vitro*

Утверждена приказом проректора по академическим вопросам № 408 – П/Ө от 23.11.2022 г.

Срок сдачи законченной работы «15» мая 2023 г.

Исходные данные к дипломной работе:

Краткое содержание дипломной работы:

- а) литературный обзор;*
- б) материалы и методы исследования;*
- в) научные результаты и их анализ;*

Перечень графического материала: *представлены 10 слайдов презентации работы.*

Рекомендуемая основная литература: *из 25 наименований 17 основных и 8 дополнительных.*

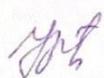
## ГРАФИК

подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю и консультантам	Примечание
Литературный обзор	12.12.2022	
Экспериментальная часть	23.01.2023 - 28.04.2023	
Обсуждение результатов	10.05.2023	
Оформление работы	15.05.2023	

## Подписи

консультантов и нормконтролера на законченную дипломную работу с указанием относящихся к ним разделов работы

Наименование разделов	Консультанты, И.О.Ф (уч.степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Аналитический обзор литературы	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	12.12.2022	
Объект, материалы и методика исследования	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	23.01.2023 - 28.04.2023	
Результаты исследования	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	10.05.2023	
Нормконтролер	А.Ч. Каташева кандидат с.-х. наук, асс.профессор	15.05.2023	

Научный руководитель



Каташева А.Ч.

Задание принял к исполнению обучающийся



Мухтарова Э.С.

Дата

«15» мая 2023 г.

## АННОТАЦИЯ

Структура и объем дипломной работы: текст дипломной работы изложен на 43 страницах. По содержанию диплом охватывает три основных раздела: литературный обзор, экспериментальная часть и результаты проведенных опытов. В дипломной работе имеется библиографический список использованной литературы, содержащий 25 наименований. В документе дипломной работы содержится 10 рисунков и 3 таблицы.

*Актуальность дипломной работы.* Амарант обладает уникальными биологическими свойствами, обладает способностью поглощать большое количество ионов радионуклидов и солей тяжелых металлов из состава почвы и накапливать их в запасном состоянии. Физиологико-биохимические особенности этого растения также до конца не изучены. Поэтому получение каллусов и эмбрионов, а из них целых растений в пробирке путем культивирования тканей данного растения в искусственном состоянии является одной из актуальных проблем на сегодняшний день

*Объект исследования.* Амарант

Целью настоящей работы является исследование устойчивости растений амаранта и каллусных тканей, полученных из них *in vitro*, к солевой среде.

*Полученные результаты.* Проведен мониторинг устойчивости амаранта к солевым растворам тяжелых металлов.

*Ключевые слова:* Амарант, тяжелые металлы, концентрация солевых растворов, химический анализ.

## АҢДАТПА

*Дипломдық жұмыстың құрылымы мен көлемі:* дипломдық жұмыстың мәтіні берілген 43 бет. Мазмұны бойынша диплом үш негізгі бөлімді қамтиды: әдебиеттерге шолу, эксперименттік бөлім және эксперименттердің нәтижелері. Диссертацияда 25 атаудан тұратын пайдаланылған әдебиеттердің библиографиялық тізімі бар. Диссертациялық құжатта 10 сурет және 3 кесте бар.

*Дипломдық жұмыстың өзектілігі.* Амаранттың бірегей биологиялық қасиеттері бар, ол топырақтың құрамынан радионуклидті иондар мен ауыр металл тұздарын көп мөлшерде сіңіріп, оларды резервтік күйде жинақтайды. Бұл өсімдіктің физиологиялық және биохимиялық сипаттамалары да толық зерттелмеген. Сондықтан бұл өсімдіктің ұлпаларын жасанды күйде өсіру арқылы калли мен эмбриондарды және олардан бүтін өсімдіктерді *in vitro* жағдайында алу бүгінгі күннің өзекті мәселелерінің бірі болып табылады.

*Зерттеу объектісі.* Амарант

Бұл жұмыстың мақсаты амарант өсімдіктері мен олардан алынған каллус ұлпаларының *in vitro* жағдайында тұзды ортаға төзімділігін зерттеу.

*Нәтижелер.* Амаранттың ауыр металдардың тұз ерітінділеріне төзімділігіне мониторинг жүргізілді.

*Негізгі сөздер:* Амарант, ауыр металдар, тұз ерітінділерінің концентрациясы, химиялық талдау.

## ANNOTATION

*The structure and volume of the thesis:* the text of the thesis is set out on 43 pages. In terms of content, the diploma covers three main sections: a literature review, an experimental part, and the results of the experiments. The thesis contains a bibliographic list of used literature containing 25 titles. The thesis document contains 10 figures and 3 tables.

*The relevance of the thesis.* Amaranth has unique biological properties, it has the ability to absorb a large amount of radionuclide ions and heavy metal salts from the composition of the soil and accumulate them in a reserve state. The physiological and biochemical characteristics of this plant are also not fully understood. Therefore, obtaining calli and embryoids, and from them whole plants in vitro by cultivating the tissues of this plant in an artificial state, is one of the urgent problems today.

*Object of study.* Amaranth

The aim of this work is to study the resistance of amaranth plants and callus tissues obtained from them in vitro to a salt environment.

*Results.* The monitoring of amaranth resistance to salt solutions of heavy metals was carried out.

*Key words:* Amaranth, heavy metals, concentration of saline solutions, chemical analysis.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Растение амарант	10
1.2 Влияние тяжелых металлов на рост растений	12
1.3 Гипераккумулятор и фиторемедиатор растений	13
1.4 Морфогенез клеток растений	13
1.5 Культура клеточной суспензии	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1 Вегетативные исследования	26
2.2 Выращивание растительной клетки <i>in vitro</i>	27
2.3 Определение накопления тяжелых металлов атомно-абсорбционным методом	28
3 НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ АНАЛИЗ	29
3.1 Влияние различных концентраций тяжелых металлов на рост побегов	29
3.2 Динамика накопления тяжелых металлов в вегетативных органах амаранта	30
3.3 Способность амаранта образовывать каллусы и влияние фитогормонов в зависимости от происхождения эксплантата	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ОХРАНА ТРУДА И БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	46

## ВВЕДЕНИЕ

К одной из главных проблем в сфере сельского хозяйства и экологии последних лет можно отнести загрязнение почвы, воды и воздуха различными вредными веществами. Виды загрязнителей окружающей среды встречаются в большом количестве. Их размер также увеличивается с годами. К ним можно отнести и соли тяжелых металлов. Их вредное воздействие на живой организм, в последние годы, начали интенсивно изучать. В связи с этим выращивание растений, устойчивых к соляной среде, получение их новых форм, устойчивых к такой среде, и биологическая очистка соляной среды являются основной проблемой фитофизиологии сегодня. Среди них можно выделить место очистки почвы с помощью растений (фиторемедиации). Для таких работ амарант также является одним из подходящих растений.

Амарант обладает уникальными биологическими свойствами, обладает способностью поглощать большое количество ионов радионуклидов и солей тяжелых металлов из состава почвы и накапливать их в запасном состоянии. Для этих целей, наряду с другими растениями, в последние годы виды амаранта все чаще используются для очистки почв, загрязненных вредными соединениями, такими как соли тяжелых металлов, радионуклиды и т.д. Выращивание амаранта в Казахстане до сих пор не налажено, и только в последние годы его начали выращивать только в некоторых хозяйствах республики. Более того, физиологико-биохимические особенности этого растения также до конца не изучены. Поэтому получение каллусов и эмбриоидов, а из них целых растений в пробирке путем культивирования тканей данного растения в искусственном состоянии является одной из актуальных проблем на сегодняшний день. Более того, такие эксперименты также можно рассматривать как незаменимые модельные практики, которые можно продолжать проводить в любое время, не считая времени года.

Цель выпускной работы:

Исследование устойчивости растений амаранта и каллусных тканей, полученных из них *in vitro*, к солевой среде.

Задачи работы:

- Изучение влияния тяжелых металлов (Cd, Cu, Zn) на рост и развитие растения амарант.
- Извлечение каллусов из тканей растения амарант *in vitro*.
- Получение суспензионных культур из каллусов и изучение их склонности к солевой среде.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Амарант

Амарант (лат. *Amaránthus*) – распространенное однолетнее теплолюбивое травянистое растение. Цветет с августа до снегопада, цветки мелкие. Известно 55-65 видов, встречающихся в теплых и умеренных регионах.

Некоторые виды амаранта (*Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus blitum* и др.) широко распространены как сорняки. А такие виды, как *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus paniculatus*, когда-то использовались в качестве зерновых культур и до сих пор используются в качестве зерна в некоторых странах. В некоторых странах (особенно в Восточной Азии) амарант (*Amaranthus gangeticus*, *Amaranthus mangostanus* и другие виды) выращивают как овощные растения. Из-за темно окрашенного листа и свисающего цветка (*Amaranthus caudatus*, *Amaranthus hypochondriacus* и др.) выращивают в декоративных целях.

Ботаническое название - греческое Αμάρανθος или Αμάραντος («амарантос»: «а» - не, «мараино» - увядающий, «антхос» - цветок - не увядающий цветок). Сушеный амарант может сохранять свою форму в течение 3-4 месяцев, поэтому его редко сушат зимой. По этой причине в народе амарант называли «зимним другом человека».

Одно растение дает 1000 штук или 0,4 г зерна. Зерно состоит из 16 % белков, 5-6 % жиров, 55- 62 % крахмала, пектина, макро-и микроэлементов. В амаранте содержание белка лизина выше, чем в пшенице. Основную часть жира в составе составляют ненасыщенные жирные кислоты (олеин, линолевый, линоленовый).

Амарант используется в различных странах в пищу (зерно, молодые листья), в качестве корма (зеленое зерно для свиней, силос для всех видов скота (силос), зерно для птиц и домашнего скота) и в технических (масличных) целях. Незаменимая аминокислота адекватного баланса в составе белка, витамины, жиры, крахмал и минеральные соли являются незаменимым элементом зерна амаранта в пище человека.

Виды культуры *A.lividus* L., *A.retroflexus* L., *A.blitum* являются завезенными *A.blitoidus* L., *A.lividus* L., *A.albus* L., *A.blitum* L., *A retroflexus* L.- считаются широко распространенным сорным растением; *A.paniculatus*, *A.caudatus*, *A.tricolor* - распространены в виде декоративных растений [1].

Основным преимуществом амаранта является высокая скорость роста (особенно при высоких температурах и солнечной погоде), благодаря этому свойству амарант хорошо конкурирует с сорной травой, к тому же он неприхотлив к почвам (кроме кислой почвы), устойчив к засухе и засолению, различным болезням и вредителям, адаптируется к условиям среды произрастания. Установлено, что листья *A. tricolor* собирают из почвы рН 6,4 Al 562 мг\кг. Алюминий не считается необходимым элементом для роста растений, но является распространенным элементом в почве. Также было исследовано, что

*Amaranthus hybrids* накапливается в корнях мед и стронций, а As, Cu, Ni, Mn, Zn и Fe в листьях [2].

Классификация амаранта:

Раздел: цветущие или скрытосеменные (Magnoliophyta или Angiospermae)

Класс: двудольные (Dicotyledones)

Подкласс: гвоздики (Caryophyllidae)

Порядок: гвоздики (Caryophyllales)

Род: амаранты (*Amaranthaceae*)

**Распространение и экология.** Амарант родом из Южной Америки, где произрастают самые разнообразные формы. Оттуда он распространился в Северную Америку, Индию и другие места. Вторым по величине центром по разнообразию амаранта считается северная Индия и Китай, в настоящее время здесь произрастают многие виды амаранта. Испанцы забрали семена амаранта из Европы и начали выращивать сначала как декоративную культуру, а с XVIII века - как злаковую и кормовую культуру; виды амаранта из-за постоянного самоопыления, впоследствии он стал загрязнять землю, превращаясь в сорную траву. Во второй половине XIX века амарант стал считаться злостным сорняком.

**Использование амаранта.** На протяжении 8 тысяч лет амарант использовался в Южной Америке и Мексике в качестве одной из основных зерновых культур наряду с бобами и кукурузой. В Азии в горных районах Индии, Пакистана, Китая амарант широко распространен как зерновая и овощная культура. Семена амаранта по вкусу и запаху похожи на орехи, и они очень легко усваиваются. Половина белков, содержащихся в семенах амаранта, являются альбуминами и глобулинами. Крахмал амаранта отличается высокой липкостью, набуханием и склеиванием. В производстве используют молоко из него в производстве кисломолочных продуктов, кондитерских изделиях, производстве пива и т.д. В листьях и стеблях амаранта обнаружено 10 видов стеролов. Также в листьях содержатся витамины (B, C, E), белки, углеводы, флавоноиды (кверцетин, треолин, рутин), минеральные вещества в больших количествах. В торговых точках Северной и Южной Америки, Китая, Юго-Восточной Азии можно найти более тридцати продуктов из амаранта: вермишель, макароны, печенье, кексы, вафли, напитки, детское питание. Молодые листья амаранта похожи на шпинат и в свежем виде используются в горячих блюдах. Также сушеные листья используют в пищу. Семена амаранта - ценный корм для домашних птиц. В качестве декоративного растения выращивают четыре вида амаранта. Три из них относятся к декоративно - цветущему растению: *A. paniculatus*, *A. Hypochondriacus* и *A. Caudatus*. Один вид - *A. Tricolor* относится к листовым - декоративным растениям. Ростки амаранта очень полезны для здоровья. Ростки используют против онкологических заболеваний. В народной медицине используют амарант для получения биологически активных веществ - амарантина, рутина, каротиноидов [3].

## 1.2 Влияние тяжелых металлов на рост растений

Тяжелые металлы — это группа химических элементов с плотностью более 5 г/см<sup>3</sup>. Для своей биологической классификации рекомендуется полагаться на атомную массу, а не на плотность металлов, что означает, что тяжелые металлы включают элементы с атомной массой более 40. Нельзя сказать, что все тяжелые металлы токсичны, потому что они также могут включать такие элементы, как Zn, Cu, Mo, Co, Fe, Mn, биологическое значение которых доказано. Некоторые из них стали известны в сельском хозяйстве как микроэлементы из-за их концентрации, необходимой живым организмам. Таким образом, понятия микроэлементы и тяжелые металлы относятся только к одному металлу, но используются для разных целей в зависимости от их концентрации в почве, удобрениях, растениях и животных. Термин «тяжелые металлы» следует использовать, когда речь идет об опасных для живых организмов концентрациях элементов с относительной атомной массой более 40, а «микроэлементы» — о безвредных очень малых концентрациях. Но есть группа очень токсичных металлов, называемых «тяжелыми». К ним относятся свинец, кадмий и ртуть. По общему мнению, они считаются особо опасными загрязнителями окружающей среды. Это потому, что они очень широко используются в транспорте и производстве. Достоверные сведения об опасной степени техногенного загрязнения пахотных земель дает анализ выращиваемых на них растений. Если принять во внимание, что основное содержание тяжелых металлов в организме человека поступает через 75–80 % питательных веществ растительного происхождения, то становится понятно, насколько важны такие исследования.

Тяжелые металлы делятся на несколько групп в зависимости от их воздействия:

1) К очень фитотоксичным элементам-растворам относятся элементы, оказывающие вредное воздействие на организм в концентрации до 1 мг/л. К таким элементам относятся  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$  и, кроме того,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{CrO}^{2-}$ .

2) Рассчитываются умеренно токсичные элементы — элементы, подавляющие рост в концентрации от 1 до 100 мг/л. Эта группа включает в себя арсенаты, броматы, хроматы, перманганаты, молибдаты, антимонаты, селенаты, а также As, Se, Bi, Ba, Cd, Cs, Fe, Mn, Zn и другие ионы.

3) К слаботоксичным элементам относятся  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  и другие элементы, которые редко проявляют обратный эффект при высоких концентрациях 1800 мг/л.

Токсичное действие тяжелых металлов варьируется. Многие металлы, такие как медь и ртуть, подавляют активность ферментов в токсичных концентрациях. Вместе с органическими молекулами эти металлы образуют компоненты, способные проходить через клеточную мембрану. Ртуть, свинец, медь, бериллий, кадмий, серебро в основном замедляют функции щелочной фосфатазы, каталазы, оксидазы и рибонуклеоазы. Тяжелые металлы, такие как

серебро, барий и железо, способны образовывать преципитаты с  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  и другими анионами, а также хелатоподобные комплексы с обычными метаболитами. Они участвуют в дальнейших метаболических процессах, нарушая функцию важного метаболита, такого как АТФ. Некоторые тяжелые металлы реагируют с клеточной мембраной, снижая ее проницаемость и другие свойства. Например, золото, кадмий, медь, железные дороги иногда приводят к разрыву клеточной мембраны. А некоторые тяжелые металлы конкурируют с металлами, которые нужны растению, нарушая его основные функции. Например, литий заменяют натрием, цезий - калием, барий, стронций-кальцием, а кадмий - цинком.

Радиоактивный изотоп можно рассматривать как отдельную группу из-за их очень высокого воздействия на окружающую среду, почву и растительность.

Микроэлементы относятся к непереходным элементам, поскольку играют важную роль в жизненно важных функциях организмов. Они являются микроэлементами, содержащимися в растении в небольших количествах, участвуют в окислительно-восстановительном процессе, фотосинтезе, азотном и углеводном обмене, а также участвуют в активности ферментов и витаминов, повышая устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды и болезням [4].

### **1.3 Гипераккумулятор и фиторемедиатор растений**

Гипераккумулятор — это вид растения, способного накапливать соли тяжелых металлов в своих вегетативных органах. Растения отличаются тем, что поглощают тяжелые металлы из почвы на разных уровнях. Это происходит по разным причинам. Т.е. зависит от физиологических, биохимических оснований растения и свойств иона тяжелых металлов, типа, находящегося в почве, и других условий.

К числу таких интересных растений относятся виды семейства *Amaranthus L.*, признанные Американской академией наук перспективной культурой XXI века [5].

### **1.4 Морфогенез клеток растений**

Многие виды клеток растений способны нормально размножаться и дифференцироваться в специальных емкостных средах. Различные тканевые и клеточные методы культивирования (калусные, суспензионные и протопластные культуры) - можно использовать в биотехнологических экспериментах для получения гомогенных клеточных популяций в молекулярно - биологии и биохимических исследованиях.

Изучение растительной клетки является подходящей моделью для изучения влияния стрессовых факторов на клетку. В клеточной технологии эффективность метода считается обусловленной возможностью получения

полностью зрелого растения из клетки на заключительном этапе. На ранних стадиях извлечения каллусов из генотипов или семян зависит от концентрации углеводов, витаминов, гормонов роста и макро- и микротрещин в питательной среде. Для индукции процесса каллусогенеза чаще всего используются питательные среды Мурасигэ - Скуг (МС) и Гамборга - В<sub>5</sub> (В<sub>5</sub>) [6].

Клетки, выросшие *in vitro*, отличаются морфологическим, биохимическим строением. Разнообразие клеточных линий или регенеративных растений называется соматклональной вариабельностью. Генетическая природа и механизм возникновения соматклональной вариабельности до сих пор полностью не изучены.

Но также можно сказать, что появление соматклональных вариантов зависит от генетической гетерогенности соматической клетки эксплантата, генетической и эпигенетической изменчивости, культивирования *in vitro*, а также от генотипа эксплантата [7]. Исследования морфогенеза в последнее время привели к большим достижениям. На это есть несколько причин. Во-первых, морфогенез - пластичный и обратимый процесс, позволяющий легко манипулировать развитием растения, контролировать стадии роста. Также в связи с тем, что в последние годы происходит развитие производства новых форм растений путем практического использования генной инженерии, знание морфогенеза считается необходимым. Изучая морфогенез, можно посмотреть на деление клеток, рост и их дифференциацию. Кроме того, генетическое развитие некоторых растений хорошо изучено, что позволяет выращивать растение *in vitro*. Для интенсивного роста каллусов процесс морфогенеза зависит от нескольких факторов: генотипа эксплантата, состава питательной среды, условий размножения. В настоящее время очень мало видов растений, произрастающих *in vitro*. К числу таких растений относится растение амарант [8].

Образование каллусов в процессе каллусогенеза обычно приводит к деференциации эксплантирующей клетки к меристематическому состоянию.

Исследование многих авторов показывает, что не все клетки, в которых образуются каллусы, имеют одинаковый рост и физиологические особенности [9].

Тип и образование каллусов в зависимости от результатов дифференциации процесс инициации образования каллусов из эксплантата соматической ткани является сложным этапом [10].

Известно, что клеточные культуры морфологически, цитогенетически неоднородны. Каллусная ткань культивируется поверхностным способом, показывает, что клетка аморфная, массивная, тонкостенная паренхиматозная, анатомического строения не имеет. Цвет каллусной культуры может быть белым, желтым, зеленым, розовым, коричневым, полностью пигментированным или хлорофилированным [11].

Во многих работах с соматической культуральной растительной клеткой выделяют два противоположных типа каллусов: 1) рыхлые; 2) плотные;

Обычно культивирование плотных каллусов считается морфогенетически важным, тогда как рыхлые каллусы используются только в экспериментах [12].

В 1989 году из соматической клетки ячменя выделили 10 типов каллусов в зависимости от морфологических признаков и типа морфогенеза.

При повторной отдельной посадке различных типов каллусов их морфология может измениться. Причина изменения обусловлена гормональными добавками, добавляемыми в питательную среду, и морфологической компетенцией клеточного типа этого каллуса. С некоторых точек зрения важен не только морфогенез клетки плотного тканевого каллуса, но и может иметь значение для рыхлого тканевого каллуса. По этой же причине, не выбрасывая рыхлые тканевые каллусы, необходимо пересаживать их в питательную среду с повышенной концентрацией и выращивать в слабо освещенном месте.

Характеристика морфогенного каллуса, нормального, упорядоченного расположения клеток и образования оболочки на поверхности клеток.

При культивировании каллусных тканей различают постоянный и измененный типы. Морфогенные рыхлые каллусы и неморфогенные каллусы оказались более стабильными. Высокоорганизованные плотные ткани, которые являются основными морфогенными, имели тенденцию к изменениям, становясь более структурированными и рыхлыми. Следовательно, сформировался тип морфогенных рыхлых, промежуточных и новых морфогенных каллусов, которые не являются морфогенными. Но структурная трансформация плотного каллуса и превращение в рыхлую ткань не всегда теряли морфогенный потенциал.

Изменение некоторых типов каллусов от одного вида к другому может перейти от более стабильных к более высоким морфогенным типам каллусов [13].

Также отличаются друг от друга по морфологическим признакам от пыльцы ячменя отделяются ткани 5 различных типов каллусов, которые представляют собой: 1) рыхлые неморфогенные каллусные ткани; 2) рыхлые эмбриогенные каллусные ткани; 3) плотные тонкопленочные каллусные ткани; 4) плотные коренные каллусные ткани; 5) плотные эмбриогенные каллусные ткани.

- Рыхлые неморфогенные каллусные ткани - крупные, в ваеализированной клетке не видно ядра, большое количество паренхиматозных клеток.

- Рыхлые эмбриогенные каллусные ткани - состоят из участков рыхлой ткани и массивной интенсивной пролиферации плотной эмбриогенной клетки.

- Плотные тонкопленочные каллусные ткани имеют корни, толстые отверстия.

- Слой эпидермальных клеток типа плотного коренного каллуса толстый, клеточный слой хорошо заметен, с отверстиями.

- Плотный эмбриогенезный тип каллуса имеет плотную паренхиматозную широкую область и очень крупные ядра в клетке.

Культивирование каллусов противоположно или полностью не влияет на генотип донорских растений [14].

Есть данные, что в некоторых случаях генотип влияет на индукцию и рост каллуса или вообще не влияет на эти показатели [15].

В других работах было обнаружено, что влияние генотипа влияет только на каллусогенез или только на интенсивный рост тканей каллуса. Противоречие этих работ друг другу сводится к тому, что изучаемые объекты являлись различными эксплантатами и генотипами [15, 16].

Выбор генотипа является наиболее важным фактором при выращивании каллуса, получении регенерата. Также было обнаружено, что генетические факторы не связаны между собой регенератором растений, который определяет интенсивность роста каллуса и извлекается из каллуса. Отсутствие связи также наблюдается у генов, контролирующих процессы; а) появление эмбрионов и их рост у растений; б) образование каллусов из соматических и генетических органов, тканей. В связи с этим культивирование каллусов высокого уровня в подборе генотипов приводит к успеху в проведении работ по выращиванию растений *in vitro*. Доказательством этому служит различная индукция культивирования каллусов в экспериментах с амарантом (*Amaranthus Sp.*) [17].

Исследования показали, что генотип растений влияет на выращивание каллусов. Способность каллуса расти зависит не только от генотипа, но и от условий среды, в которой она выращивается, и от образования иницирующих клеток. При культивировании эксплантатов, генотипы которых были идентифицированы, реакция генотипов в конкретной среде культивирования была нормальной. Эта реакция с большей вероятностью изменится, если условия выращивания изменятся. Изменения реакций могут быть обусловлены различными причинами: а) неоднородность эксплантатов возникает из тканей других клеток, отличающихся друг от друга по морфологическому потенциалу при полиферации каллусов. б) влияние сложных факторов среды, ранней тасмуляции неактивированных генов или ранней лингиберизации активных генов на последовательность клеток эксплантатов, взятых для исследования. Таким образом можно определить условия среды, чистоту индукции и рост каллусов, необходимых для любого генотипа [18].

Культурным объектом, выращиваемым *in vitro*, могут быть ткани, полученные из различных частей растения. Обычно в отдельных условиях выращивания используют стебель, ткани, первичный и вторичный камбий растения, первичные меристемы стебля, корни. при выращивании *in vitro* редко используют лепестки, цветы, пыльцу и листья.

Получение каллусов из зеленых листьев считается очень трудным, но есть данные, что эти каллусы и регенераторы можно повысить жизнеспособность с помощью различных методов, например пшеницы. Этот метод реализуется

поэтапно путем изменения концентрации фитогармонов и интенсивности падения света [19].

Наиболее важную роль играет отбор экплантата, выращенного *in vitro*. При отборе экплантата необходимо выбирать из хорошо и сильно разросшегося растения. Предварительные условия выращивания растений также важны при отборе, что влияет на дальнейший рост культурного экплантата. Если экплантат был отобран в период высокой способности растения к фактическому или прямому росту, на практике можно выращивать любую часть растения *in vitro* и получать регенеративное растение.

Не полностью развитые ткани и органы подвержены изгибу, по некоторым данным *in vitro*, такие ткани и органы обладают большей способностью к морфогенезу по сравнению со зрелыми тканями и органами. При выборе материала следует также обратить внимание на меристематически активные ткани и органы. Обычно они более удобны для клонирования, имеют более высокий уровень выживаемости при окультуривании и более быстрые темпы роста. Меристемы растут с кончика, щелевые, незрелые ткани растут очень быстро, особенно подходят в качестве экплантатов. Зрелые листья, корни, стебли, цветы травянистых растений можно успешно выращивать и культивировать, и из них можно получить регенерирующее растение путем орногенеза или соматического эмбриогенеза. В основном дифференциация самой ранней ткани экплантата является важной, поскольку она зависит от морфогенетической способности различных тканей.

В условиях *in vitro* процессы, происходящие при первичной и вторичной дифференциациях в экплантате, проявляются различными механизмами.

В зависимости от образования каллусов, корнеобразования растения размещают в следующих рядах: кустарники, многолетние растения, деревья. Исследования показали, что из семян растений разных групп образовалось несколько хороших рядов, особенно из многолетних растений, кустарников, деревьев. Образование каллусов из разных органов разных растений зависит от их способности и специализации. В зависимости от специфики строения и изученного строения, в зависимости от сложности образования специализированных экплантатов, получаемых из различных растений, можно выделить следующие: клубневые части, лист, корень, орган, цветок [20].

Некоторые исследователи говорят, что для получения хороших каллусов и регенераторов растений требуется окультуривание экплантата из листовых дисков, а некоторые исследователи указывают на то, что цельный лист имеет более высокую способность образовывать каллусы и регенератор растений, чем листовые диски.

По данным исследования, использование листового диска снижает качество экплантата: 1) уменьшает размер экплантата; 2) нарушает функцию органа; 3) из разных частей листа в большом количестве органов образуются диски, которые обычно имеют низкую способность к регенерации.

Использование листовых дисков снижает образование регенеративного растения по сравнению с использованием цельных листьев [21].

Из двух видов амаранта можно выращивать различные эксплантанты (листовой диск, сегменты гипокотелла и ростки) в питательной среде, добавляя 2,4 - Д, нафтилуксусную кислоту (НУК), кетенин с добавлением различных добавок. Рыхлые каллусы получают из всех видов эксплантантов путем добавления 0,1 - 5 мг/л 2,4 - Д. В некоторых случаях появились семена, похожие на эмбрион, что указывает на то, что из амаранта можно получить эмбриогенный урожай. В ходе исследований было замечено, что каллусы из гипотелевого сегмента образуются в 2-3 раза быстрее, чем каллусы из других органов. По сравнению с вегетативными тканями такие генеративные ткани у некоторых растений обладают высоким морфогенным потенциалом [25].

Изучение метода окультуривания и тканей растений позволит изучить клеточный и молекулярный морфогенез и создать модельную систему. Этот метод показывает моделирование морфогенетических процессов и нормальный онтогенез *in vitro*, а также позволяет определять морфогенетические процессы, определять и оценивать их реализацию в стандартных условиях. Но определение морфогенетических процессов в культуре *in vitro* не является ни трудным, ни легким. Механизм протекания морфогенеза в настоящее время мало изучен.

Процесс морфогенеза неорганизован в культуре, на которой растет каллус, и представляет собой моделирование механизма перепрограммирования дифференцировки растительной клетки и является важным для селекционной работы в формировании органов растений. В оптимальных условиях получение регенеративных растений из тканей культуральной клетки получение протопластов, выделенных из двудольных и однодольных видов растений, в настоящее время не представляет особой сложности. в условиях *in vitro* клетка эксплантата отличается от роста в нормальных условиях. Влияние различных взаимосвязей, изменение питания, изменение адаптации клетки к новой среде. клетка растения, выращенная *in vitro*, подвержена изменениям по генетическим признакам, карлотипу и влиянию других факторов среды. при культивировании культуры *in vitro* в клетке становится трудно перестраиваться дедифференцирующим путем, наблюдается разрушение новых свойств и функций, а также приводит к неограниченному размножению клетки [22].

В культуральной ткани и растительной клетке во время дедифференциации и морфогенеза происходят следующие процессы: 1) превращение основных специализированных или меристематических клеток в каллусные клетки, выделенные из растительных эксплантатов. Процесс зависит от перестройки основных клеток и способности к цепному делению; 2) дедифференцировка каллусных клеток зависит от цикла деления и специализированного синтеза вторичных соединений; 3) гистогенез процесс превращения каллусных клеток во флоэм или ксиллемальные элементы; 4) оргоногенез-образование корней или вегетативных органов и зародышей цветов; 5) соматический эмбриогенез-

процесс превращения каллусных клеток в первичные процесс переноса биполярного эмбрионидного состава [23].

В морфогенезе соматических тканей пшеницы в верхнем отделе каллусов образуются меристематические глобулы различных размеров и форм. Они состоят из крошечных изодиаметрических клеток и больших ядер, толстых цитоплазм. Через некоторое время меристематические глобулы начинают расти автономно больше, чем другие каллусные ткани. При этом клеточные глобулы не отличаются друг от друга формой и строением. В ходе развития наблюдался последовательный рост активного роста глобул в различных областях. Затем глобула увеличивается с одной стороны, из которой образуется щиток зиготного семени зерна. Далее в условиях *in vitro* на противоположной стороне глобулы наблюдается точка эмбриогенезного роста [24].

Выделение семян пшеницы считается трудным временем, так как она имеет высокую чувствительность к внутренней среде. К одной из самых сложных стадий относится «автономическая» фаза, которая сама по себе является «независимой» стадией развития. В фазе автономного развития культуры завершают полный эмбриогенез *in vitro* в зависимости от способности семян и могут быть начаты культивирование в негормональной среде [22, 23].

Отмечено, что эмбриогенезные особенности зародышевых узлов пшеницы, развитие плодов при окультуривании неоплодотворенных узлов происходит медленнее, чем в естественных условиях. 4 - 6 - клеточный проэмбрион образовался через 10-14 дней после окультуривания, а многоклеточный зародыш образовался на 25-й день окультуривания. Проэмбрион возникает из крупных клеток, полости зародышевого мешка. Дальнейшее развитие порэмбриона происходит с образованием эмбриодермы. Зародышевая оболочка возникает в результате переклинового деления проэмбриональных клеток в виде периферической оболочки. Зародыши состоят из морфологически одноплодных клеток с мелкими меристемными клетками и крупными ядрами [21].

При образовании эмбрионидов из пыльцы пшеницы в результате первичного митоза образуются две равные клетки, при последующем делении приводящие к образованию морфогенных и глобулярных каллусов. Первым этапом выделения пыльцы в культуре является образование морфогенных каллусов из микроспор и глобул. Глобула может быть связана со стенкой пыльцы, обеспечивающей пищу между суспензиями. дальнейшее развитие и дифференциация глобулы приводит к образованию проэмбриона. Нарушение связи с суспензией также влияет на дедифференциацию или дегенерацию и каллусогенез с развитием глобул.

Эмбриониды имеют плотную форму, овальную, стеблевую, корневую зачатки. Такие эмбриониды можно высаживать в среду-получать регенераторы растений.

Глобулы могут дифференцироваться и превращаться в эмбриониды. Кроме того, на этом этапе они могут дифференцироваться, и из них могут образовываться морфогенные каллусы.

Не все каллусы способны к дифференциации. Такое свойство наблюдается только у каллусов, которые становятся белыми, плотными. Сначала в верхней части каллусов образуется эмбриональный клеточный комплекс (экк), в котором мелкие меристематические клетки и крупные ядра отличаются от других тканей. В результате множественного деления эмбрионального клеточного комплекса образуются глобулы, из которых позже формируются вторичные эмбриониды. Эмбриониды имеют биполярное строение, корневые и стеблевые аспекты. Расположение каллусовых тканей вторичных эмбрионидов делится на два типа: 1) образование каллусов на верхней поверхности; 2) активное деление меристематических центров внутрь. Первичная стадия развития вторичных эмбрионидов находится в очень тесном контакте с каллусами, а на поздних стадиях из каллусов наблюдалось, что эмбриониды расположены в отдельной автономной системе. В критические периоды из эмбрионидов могли выходить регенеративные растения [25].

Изучение развития семян в культуре позволяет предсказать характер суспензии. На ранних стадиях окультуривания образуется эмбриональная суспензионная клетка *in vitro* эксплантата регенеранта *Ranuculus* и развивающихся семян, функционально активный суспензиор при этом не образуется. Потому что в условиях *in vitro* семена поглощают питательные вещества сверху. При этом, будучи суспензиором, она не выполняет функциональную нагрузку.

Можно предположить, что основная причина, вызывающая дедифференциацию клеток и их переход из гистогенеза в следующую структуру оргоногенеза, связана с действием фитогормонов. Определение типа того или иного морфогенеза основным фактором является наличие ауксина и цитокинина в питательной среде. Эта закономерность была впервые обнаружена Скугой и Миллером. Согласно их концепции, стебли, корни или недифференцированные каллусы можно получить, изменив соотношение ауксина и цитокинина в питательной среде.

По сравнению с оргоногнозом, роль гормонов в соматическом эмбриогенезе и тканях менее заметна. Регуляция эмбриогенеза обусловлена наличием 2,4 -Д в питательной среде. Он обеспечивает рост массы клетки.

В среднем соотношении ауксина и цитокинина от табачных каллусов наблюдалась только полиферация клеток, процесс регенерации которых не наблюдался. В верхнем соотношении ауксина и цитокинина приводит к образованию корней (ризогенез), в нижнем - к образованию клубневых узлов (геммогенез). Кроме того, каллусная ткань, выросшая в одной пробирке, может быть инициатором первичного морфогенеза, а также ризогенеза, геммогенеза и эмбриогенеза, что указывает на влияние концентрации фитогормонов на каллусную ткань. Тот факт, что такая универсальность фитогормонов зависит от их концентрации и соотношения в клетке, или их эффект зависит от того, являются ли они менее специализированными по сравнению с животными гормонами.

Присутствие ауксиносодержащего комплекса эмбриональных клеток (экк) в питательной среде приводит к полиферации клетки, образующей комплекс эмбриональных клеток, и прекращению дифференциации эмбрионов. При первой посадке отдельных клеток в питательную среду без 2,4 - Д. из каллусов или массы проэмбриональных клеток образовались семенные глобулы. Но также наблюдалось, что в питательной среде 2,4 - Д ниже установленного количества или при дальнейшем окультуривании при низких концентрациях 2,4-Д образовывались соматические семена.

Специфика гормональной регуляции в эмбриогенезе заключается в том, что гормон в очень низких концентрациях необходим только на этапах процесса индукции, а также в качестве помощи клетке во время внутриутробного развития и в начале эмбриональной дифференцировки. В дальнейшем развитии гормон не нужен плоду, а используется только для развития аномального строения в питательной среде [12, 14].

Функцию 2,4 - Д, ИУК, БАП в процессе эмбриогенеза можно определить следующим образом: на 1 этапе происходит дифференцировка соматической клетки под действием 2,4 - Д, происходит детерминированное развитие клеток, возникающих под действием БАП; на 2 этапе под влиянием ИУК и БАП эмбриогенные клетки делятся и дифференцируются в эмбриониды.

Понимание функции гормональных регуляторов на индукцию эмбриогенеза в процессе роста и влияние регуляторов на рост позволяет, во-первых, смоделировать процесс возникновения эмбриогенеза и использовать его в исследовательских целях зиготного плода, а во-вторых, понять состав проросших клеток и динамику генетического развития [13].

Известно, что при круглогодичном проведении соматического эмбриогенеза незрелых семян ячменя (12 посадок) эмбриогенный потенциал сохраняется в питательной среде. При количестве 2,4-Д 4,0 мг\л и 7,0 мг\л потенциал не уменьшался даже при 12-ти посадках. При содержании 2,4-Д в питательной среде 2,0 мг\л эмбриогенная способность каллусов снижена, концентрация 2,4-Д 4,0 мг\л оптимальна для роста каллусов и дифференциации эмбрионов. Из большинства каллусов в среднем образовалось 25 эмбрионидов, общее количество всех составляет 35-40 эмбрионидов. Ингибировал эмбриогенез и рост при добавлении 2,4-Д в питательную среду 10,0 мг\л и 16,0 мг\л. Низкая концентрация 2,4 -Д стабилизировала эмбриониды каллусов, а высокая концентрация привела к образованию новых эмбрионов. Цитокинин снижал рост и эмбриогенный потенциал каллусов [14].

Установлено, что в гометофите материнской ткани пшеницы различный состав эмбриогенеза обусловлен гормонами. При добавлении в питательную среду 2,0 мг\л 2,4 - Д, 6 мг\л, 8 мг\л кинетина семена образовались из нуцеллусной клетки. При концентрации 2,4-Д - 2,6 - 4,4 мг\л, ИУК 2,0 - 2,8 мг\л, кинетин 6,0 - 10 мг\л при окультуривании наблюдается изменение, что указывает на то, что наличие ауксина и кинетина в питательной среде очень важно [15].

Возникновение соматического эмбриогенеза из тканей и органов культуральной клетки может происходить прямым или неточным путем. Эмбриогенез, который происходит прямым путем, будет связан с образованием одного или нескольких вегетативных плодов, и на этом этапе не будет стадии образования каллусов. При изучении цитрусовых растений было замечено, что ткань нуцеллус иницирует нуцеллусовый зародыш.

Непрямой эмбриогенез состоит из нескольких этапов: культивирования трансплантата и формирования предродовых тканей, регуляции роста без фактора роста для индукции каллусов в питательную среду и образования неполярных плодов из предродовых тканей.

Зародыши развились при посеве в питательной среде, содержащей 2,4 -Д китайского сельдерея. При проведении полного анализа развития белков в проэмбриоде применялся метод электрофореза. В результате наблюдалось изменение белков в период проэмбрио. Сходство между аналогичным строением проэмбриона и его белковым составом обнаружено и изучено в сорока слоях. По рассмотренным данным выявлен процесс синтеза белка в клетке исследуемого эксплантата и влияние на органоогенез и эмбриогенез известного определенного структурного типа белков.

В настоящее время выявлено несколько факторов, влияющих на регуляцию эмбриогенеза *in vitro*. К ним относятся соединения азота в питательной среде, калий, неорганические ионы, а также углеводы, витамины и регуляторы роста.

Согласно концепции стюрда, в настоящее время эмбриогенезный путь к изоляту соматических клеток практически полностью приостановлен. К этому следует отнести то, что при взятии на исследование отдельных паренхиматозных клеток моркови, по результатам исследования установлено, что первое возникновение эмбриогенеза происходит из многоклеточных агрегатов. Об этом свидетельствуют результаты исследования каллусов *Ranunculus sceleratus L* под микроскопом.

Существует несколько гипотез, связанных с течением соматического эмбриогенеза:

1) Прямой эмбриогенез — это клетки, ранее детерминированные в эмбриологическом развитии, то есть так называемые преддетерминированные клетки. Клетки, которые нуждаются только в регулировании роста или нуждаются в благоприятных условиях для перехода к клеточному делению и экспрессии.

2) Непрямой эмбриогенез — это клетки, которые требуют полиферации каллусов и редетерминации дедифференцированных клеток в развитии до эмбриогенного состояния. Такие индуцированные эмбриогенные дидифференцированные клетки нуждаются в регуляторах не только во время первичного клеточного деления, но и во время детерминации эмбриогенного состояния [6, 8].

Рахимбаев И. Р и другие авторы получили 40 эмбрионов путем окультуривания первичных каллусных трансплантатов в питательной среде. В него добавили 5 мг\л НУК и 0,1 мг\л БАП. Таким образом, соматический эмбриогенез показывает, что наличие НСК в культуральных клетках и тканях на высоком уровне в питательной среде играет ключевую роль в клеточной дифференцировке ауксина и возникновении соматического эмбриогенеза каллусной ткани.

Процесс соматического эмбриогенеза происходит в два этапа: 1) эмбриогенная индукция клеток в верхних конечностях ауксина (эмбриогенезные клетки, проэмбрио, проэмбриогенные клетки). 2) развитие эмбриогенной массы без ауксина или в зависимости от концентрации ауксина [7].

**Клеточная селекция.** Выбор клеток основан на отборе растений-регенераторов с генетическими изменениями в присутствии селективных агентов и происходящих из них.

Спонтанный и индуцированный мутагенез растений в клетках, тканях и протопластах представляет интерес для селекционеров. Центральное место занимает высокая устойчивость растения к неблагоприятным факторам среды, низким температурам, солености почвы, токсическому загрязнению природы, воздействию вредителей и болезням. Эти факторы играют важную роль в селекции клеток. В этих условиях из него можно получить регенерирующее растение, если клетки сохраняют свою жизнеспособность. В качестве селективного агента используют соблазнительные, солевые и водные стрессогенераторы (хлорный натрий (NaCl), полиэтиленгликоль (ПЭГ), маннитол), фито - и патотоксины, антибиотики, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, производные пуринового и пуримидинового ряда, производные аминокислот и др. Для проведения клеточного отбора используются следующие методы: прямой отбор (позитивный), выживает только определенный тип ищущих мутантных клеток; не прямой (негативный) отбор, гибель делящихся клеток дикого типа и выживание метаболитических неактивных клеток, но требует идентификации их дополнительных мутационных изменений. Прямой отбор относится к распространенным методам и используется для выделения устойчивого регенеративного растения, такого как гербициды, антибиотики, токсины, тяжелые металлы, соли и другие антиметаболиты.

Клетки в популяции находятся в различных физиологических условиях, делятся, растут, стареют, умирают. Разнообразие суспензионной культуры невелико по сравнению с культурой каллусной ткани на агаре, что связано с нормальной питательностью, аэрацией, регулярным очищением от токсичных веществ из питательной среды. В фазе экспоненциального роста клетки роста суспензионной культуры удваиваются за 1 день. Культивирование суспензионной культуры позволяет получить в производстве крупномасштабную растительную клетку [12].

## 1.5 Культура клеточной суспензии

Клеточную суспензию можно получить из каллусной ткани. Для этого можно использовать ферменты, например: пектиназа. Суспензию получают из тканей эксплантата (лист, стебель, корень и др.). Сначала из верхней части эксплантата образуется каллус, затем из него образуются клетки и клеточные агрегаты, затем образуется клеточная суспензия.

Для получения 100 мл клеточной суспензии требуется 2-3 г новой каллусной ткани.

Клеточная суспензия должна иметь благоприятные условия, которые необходимо регулярно переносить в новую клеточную среду.

Высвобождению клеточной суспензии необходимы питательные гормоны для нормального роста и индукции каллусной ткани, а также ауксин и цитокинин в питательной среде. Суспензия лучше всего извлекается из рыхлой каллусной ткани в питательной среде с добавлением 2,4 -Д. Присутствие иона кальция в питательной среде облегчает образование суспензии. Кроме того, присутствие фермента пектиназы в питательной среде также важно для активного протекания этого процесса. Он разрушает пектат кальция из отдельных прикрепленных клеток.

В биотехнологии клеточная суспензия используется для получения вторичных метаболитов. Многие из них являются ценными лекарствами, которые используются для увеличения биомассы клеток в производстве и являются ценными в селекции клеток. Клеточная суспензия также может использоваться в качестве основного материала для получения отдельных порошков. Суспензионная культура используется в периодическом или потоковом режиме ферментативной открытой или закрытой системы при культивировании клеток с использованием в качестве продуцента вторичного вещества. В закрытой системе клеточная суспензия не перемещается в новую питательную среду до конца культивирования, а в открытой системе в непрерывном режиме обновляет питательную среду во время культивирования. При культивировании в открытой системе, как в периодическом режиме, клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при их замене. Однако при замене питательной среды (периодической или непрерывной) при окультуривании в открытой системе часть клеточной суспензии удаляется вместе со средой [9, 10].

**Главная характеристика суспензионных культур.** Для работы с суспензионной клеткой необходимо знать их характеристики: жизнеспособность, плотность культуры клеточной суспензии, уровень агригирности, скорость роста.

Жизнеспособность клетки определяется окрашиванием ее краской (метиленовым синим). При окрашивании клеточные мембраны живых клеток не окрашиваются из-за непроницаемости красок, а мертвые клетки легко

окрашиваются и они окрашиваются в синий цвет. Существует такой закон: если при окрашивании 50% клетка не окрашивается, она считается живой.

Основными показателями, характеризующими состояние клеточной суспензии, являются плотность популяции одной клетки. Количество клеток определяют, глядя на мицелляцию (после выделения клеток) под микроскопом сетчатой камерой Фукса - Розентеля. В качестве мицерирующего вещества используют хромовую кислоту (10 - 20 % - вертикаль).

Хорошо выросшая суспензия растет с S - образной кривой, как каллусная культура. Рассматривает три фазы цикла роста суспензии:

- Лаг - фаза (2-3 дня);
- Фаза экспоненциального роста (2-10 дней);
- Стационарная фаза (10 - 15 дней).

Продолжение фаз будет зависеть от вида растения и первого эксплантата, из которого был получен каллус, количества клеток, условий роста. Обычно посадка занимает от 14 до 16 дней. При этом плотность увеличивается с  $5 \times 10^4$  до  $5 \times 10^6$  кл/мл. Для субкультивации суспензии экспоненциально принимают в конце фазы. Увеличение количества клеток во влажной и сухой массе является его главной критерией.

Качество суспензии будет зависеть от агрегатности клетки. Агрегаты должны быть не более 10-12 клеток. Поэтому для удаления крупных агрегатов суспензию фильтруют, пропуская через марлю, нейлон, металлический фильтр. Это также позволяет избавиться от излишков эксплантантов и частиц крупных каллусов. Суспензионную культуру распределяют по уровню агрегата. Он бывает мелкоагрегированным, среднеагрегированным, крупноагрегированным.

Для посадки суспензионной культуры в твердую питательную среду берут мелкоагрегированную суспензию и высаживают на агар. Из этого выделяются отдельные клетки в небольшом агрегате и клетки, образующие каллусную ткань. Из каллуса в дальнейшем прорастает регенеративное растение [11].

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Вегетативные исследования



Рисунок 1 – проведения выпускной работы

Объектами исследования являются два вида амаранта, выращенные в пластмассовых емкостях размером 15×13 см и полученные с полей (*A.paniculatus* и *A.tricolor*). Рисунок 2.



*A. paniculatus.*



*A. tricolor*

Рисунок 2 – Вид амаранта, использованный в эксперименте.

Почва, в которой проводится исследование (рН 6,3) в виде соли:  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (50,75, 100 мг/кг);  $\text{CuSO}_4 \text{H}_2\text{O} \times 5\text{H}_2\text{O}$  (75, 100, 150 мг/кг);  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (150, 225, 300 мг/кг), вода и удобрение (0,15 г N : 0,1 г  $\text{P}_2\text{O}_5$  :  $\text{K}_2\text{O}$ ). Для контроля роста растения высаживают в почву без добавления соли и металла. Исследование повторялось три раза.

Вегетационное исследование длилось от 125 до 145 дней. Для изучения транспорта и локализации тяжелых металлов с фиксацией растения и исследуемого материала (корень, стебель, лист с 70% спиртом) проводили в различные вегетационные периоды (на побегах, во время бутонизации, цветения). В то же время были взяты образцы для определения накопления тяжелых металлов в почве.

## 2.2 Выращивание растительной клетки *in vitro*

Получение первой культуры каллусов из амаранта. Для получения каллусов питательная среда должна содержать минеральные соли, витамины, гормоны роста, компоненты, необходимые для роста и развития клетки.

Культивирование эксплантантов амаранта в питательной среде Мурасиге - Скуг (*A.tricolor*, *A.paniculatus*). Два вида амаранта для культивирования *A. tricolor*, *A.paniculatus* получены листья эксплантантов и гипокотель асептических побегов. Семена замачивают на 3-5 минут в 70% этаноле для стерилизации. Стерилизованные материалы выращивают в пробирке в воде, дистиллированной в бумажном пузыре. Растение выращивают для получения эксплантантов до 10 дней. Эксплантант высаживали в питательную среду Мурасиге - Скуг (МС) с добавлением 2,4 - Д и кинетина в различных концентрациях. Мы культивировали каллусы при 28° С, которые пересаживали каждые 4 недели в

новую питательную среду. Первый интенсивный рост каллусов наблюдался через 30 дней после культивирования.

Накопление солей тяжелых металлов в материале 3-,5-,7-,10-, вид дневного амаранта (*Amaranthus paniculatus*, *A.tricolor*, гибридный *A.hybridus K-343*). Проращивание проращивали около 14 часов при комнатной температуре при 1500 лк света в растворе 1\6 Кноп (рН 6,2-6,4).

*Получение суспензионной культуры.* Для получения суспензии выбирают светло-желтую глобулярного каллуса с гладкой поверхностью и рыхлой структурой. При посеве в жидкую среду выделяют морфогенные участки каллусов. 1-2 г каллусной ткани помещают в колбу с 30 мл питательной среды (емкостью 250 мл). В аминокислотную питательную среду (АА) используют 2.0 мг\л 2,4 - Д, 0.1 мг\л кинетиновую и гибберелловую кислоты, рН должен быть 5.8. Суспензию окультуривают в шейкере (качалке) под светом в режиме 120 объем\мин 27+1 С. Через 6 - 8 месяцев можно получить морфологически однородную суспензионную культуру с активным ростом, плотной цитоплазмой и тонкой клеточной оболочкой.

### **2.3 Определение накопления тяжелых металлов атомно-абсорбционным методом**

Тяжелые металлы определяли атомно - абсорбционным методом с использованием спектрофотометра ААС - IN фирмы Carl - Zeiss, пламенного распылителя. Для обнаружения тяжелых металлов в почве и растениях использовался метод увлажнения и осушения, минерализации. Образцы с растения сушили в сушилке при 150° С в течение 1,5 часов. Продукты с влажностью ниже 20% обжигают до тех пор, пока пар не исчезнет в электроплите. Минерализацию образцов проводят до образования пепла желтого цвета с постепенным повышением температуры электроплиты каждые 30 минут на 50°С, повышая температуру электроплиты до 450°С. Чашу с золой желтого цвета вынимают из электроплиты, охлаждают при комнатной температуре и смешивают желтую золу с 1 мл раствора азотной кислоты. Затем кислоту сушат слабым нагревом в электроплите и держат чашу в электроплите 250°С, постепенно повышая температуру до 450°С в течении 1 часа. Минерализация прекращается, когда цвет золы становится белым или слабо окрашивается. Далее материал помещают в мерную колбу и заливают 10 мл дистиллированной воды. Концентрация металла определяется по следующей формуле:

$$C\% = \frac{g \cdot k}{V \cdot p} \cdot 100$$

g - концентрация металла в растворе (мкг\мл) (определяется кривой калибра), V - объем раствора (мл), p - общий вес (г), k - коэффициент разбавления [14].

### 3 НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ АНАЛИЗ

#### 3.1 Влияние различных концентраций тяжелых металлов на рост побегов

В качестве материала для изучения влияния накопления солей тяжелых металлов использовались 3-,5-,7-,10-дневные ростки амаранта (*A. paniculatus*, *A. tricolor*, гибриды *A. hypochondriacus*, *A. hybridus K-343*). Очень простой метод - провести тест на изучение влияния тяжелых металлов на прорастание и процесс роста побегов в различных концентрациях. Основной задачей тестирования является определение степени влияния различных концентраций в растворе на прорастание и рост побегов. В процессе экспериментов концентрация тяжелых металлов ингибировала процесс роста, а при длительном выращивании приводила к повреждению или гибели растения. Прорастание - это самая первая и самая важная стадия растения, когда из состояния покоя начинается выживание семян и в конечном итоге приводит к появлению ростков. Влияние солей тяжелых металлов в различных концентрациях (длина и распределение корней) определяли в зависимости от роста побегов. Результат представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние на рост побегов амаранта в различных концентрациях кадмия и олова

#### *A. Paniculatus*

Время экспозиции		Концентрация тяжелых металлов, М					
		Контроль	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$
<b>Cd</b>	3	100%	95	73	54	28	7
	7	100%	80	63	38	15	4
	10	100%	54	40	29	7	-
<b>Zn</b>	3	100%	130	96	78	55	29
	7	100%	73	70	65	39	13
	10	100%	68	65	52	28	8

В таблице 1 показано, что рост побегов зависит от концентрации солей тяжелых металлов. Концентрация кадмия ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$ М) не подавляет рост побегов, то есть не наблюдается снижения роста побегов и наблюдается нормальное развитие. Концентрация ( $10^{-4}$ - $10^{-2}$ М) на практике летальна, и при длительном выращивании было замечено, что растение повреждено и погибло.

### 3.2 Динамика накопления тяжелых металлов в вегетативных органах амаранта

Обеспечивает устойчивость растения к тяжелым металлам молекулярным и физиологическим механизмом. Она обусловлена природой металла и спецификой видов организма.

Устойчивость высших растений к тяжелым металлам происходит двумя путями: а) выброс тяжелых металлов, попавших в клетку, б) запуск механизма внутренних клеток. В наших исследованиях устойчивость амаранта (*A. tricolor*, *A. Paniculatus*) к ионам тяжелых металлов показала, что наличие высоких аккумуляторных свойств обеспечивает металлоторерантность построения внутреннего клеточного механизма.

Влияние тяжелых металлов (Cu, Cd, Zn) на рост и развитие амаранта (*A. tricolor*) в фазе вегетации показано на рис.3

Здесь показано, что исследуемые металлы не оказывают такого же влияния на рост и развитие растений. В то время как Zn (4,5 моль) и Cd (0,9 моль) создают условия для роста растений, Cu (2,3 моль) подавляют процесс роста.



1 – контроль, 2-Cd (100 мг\кг), 3 - Cu (150 мг\кг), 4 - Zn (300 мг\кг).

Рисунок 3 – Влияние металлов на рост и развитие амаранта *A. tricolor*

Эти результаты отражают различия растений в накоплении определенных групп тяжелых металлов. Определены индикаторы растений, связанные с накоплением металлов. Известно 40 видов растений, которые собирают себе Ni в определенном количестве. К числу таких растений относится *Alyssum bertolonii*, собирающий до 1 % Ni в сухих листьях. В качестве индикатора алюминия выделяют виды *Symplocos*. По данным Фабары, в сухом листе *S. spicata*

содержится 7,23 % алюминия. Многие растения являются индикаторами меди. К таким растениям относится *Polycarpaea spirostylis*, встречающийся во флоре Австралии. В настоящее время считается аккумулятором для около 400 тяжелых металлов, большая часть которых является гипераккумулятором Ni. Дальнейшие исследования показывают, что другие виды подродовых растений *Thlaspi*, *Brassica*, *Silene* и *Alyssum* являются эффективными в аккумуляции Cd, Pb, Cu, Zn, Al, кроме Ni. К растениям универсального типа в наших исследованиях можно отнести семейство вида *Amaranthus L.*

В качестве солей тяжелых металлов используют ацетаты, относящиеся к «инертному» аниону, изменяющие pH среды меньше. Влияние Zn на рост и развитие амаранта показано на рисунке 4. Влияние концентрации Zn в контрольных результатах и по сравнению с ними регулировало рост и развитие растений. Даже при высокой концентрации в фазе вегетации (300 мг\кг) наблюдается увеличение биомассы *A. tricolor*. Такой показатель *A. paniculatus* даже при известной концентрации кадмия в почве можно наблюдать увеличение биомассы растения в течение вегетационного периода.

Нахождение большого количества элементов в растении связано не с его физиологическими потребностями, а только с обнаружением тяжелых металлов в почве. На рисунке 4 показана динамика накопления Zn в разных концентрациях на корнях, стеблях и листьях растений двух видов амаранта при исследовании.



1 – Контроль, 2-100 мг\кг, 3-250 мг\кг, 4-300мг\кг

Рисунок 4 – Влияние Zn в различных концентрациях на рост и развитие амаранта *A. tricolor*.

Было показано, что различные концентрации Zn накапливаются во всех исследуемых органах. Максимальное накопление Zn в фазах вегетации и бутонизации наблюдалось при концентрации 300 мг\кг. Во всех проведенных

исследованиях *A. tricolor* собрал большое количество Zn по сравнению с *A. paniculatus*. Олово в основном обладает слабым фитотоксическим действием, которое можно найти только в больших количествах в почве. Многочисленные исследования, проведенные в последние годы, показали, что небольшая концентрация олова оказывает благотворное влияние на рост и развитие сельскохозяйственных растений, урожайность. Влияние большого количества олова в почве на рост и развитие растений не изучалось. Известно, что в высоких концентрациях олово влияет на функцию некоторых ферментов роста. Было показано, что большое количество олова ингибирует активность фермента карбоксилазы дрожжей, а также активность фермента оксидазы растений.

Накопление Zn в вегетативных органах растения, по-видимому, связано с наличием металла в почве и фазой развития. Количество Zn в почве уменьшается вдвое по мере развития растения и в конце фазы бутонизации. А в этот период, наоборот, увеличивается количество Zn в вегетативных органах растения. В некоторых исследованиях содержание Zn было 568 мг\кг в листе *A.tricolor*, что сопоставимо с гипераккумуляторными растениями *caerulescens*, *Silene vulgaris* и *Alyssum*, которые могут накапливать до 500 мг\кг Zn в сухом листе. Медь относится к источнику биоэлементов, она постоянно присутствует в составе почвы, растений, тканей животных и участвует в различных метаболитических реакциях.

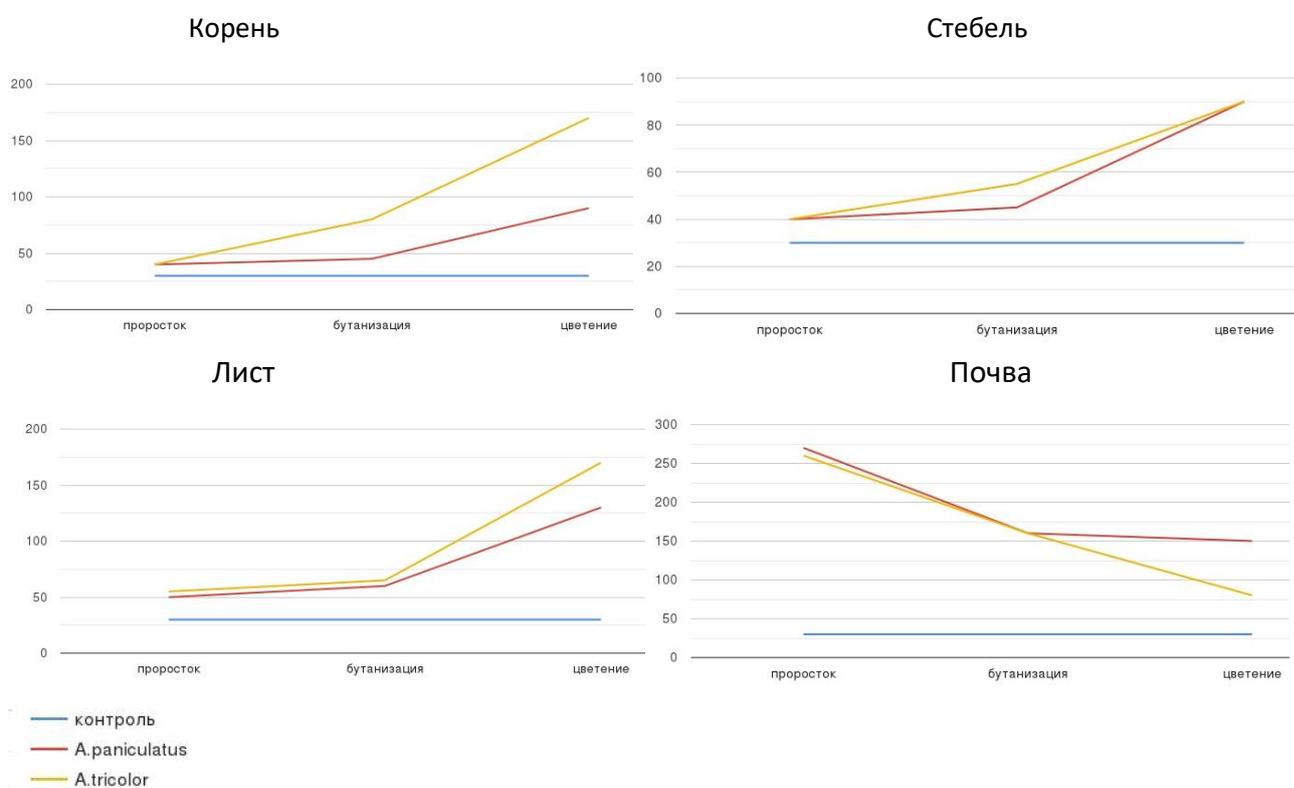


Рисунок 5 – Накопление олова в почве и вегетативных органах амаранта



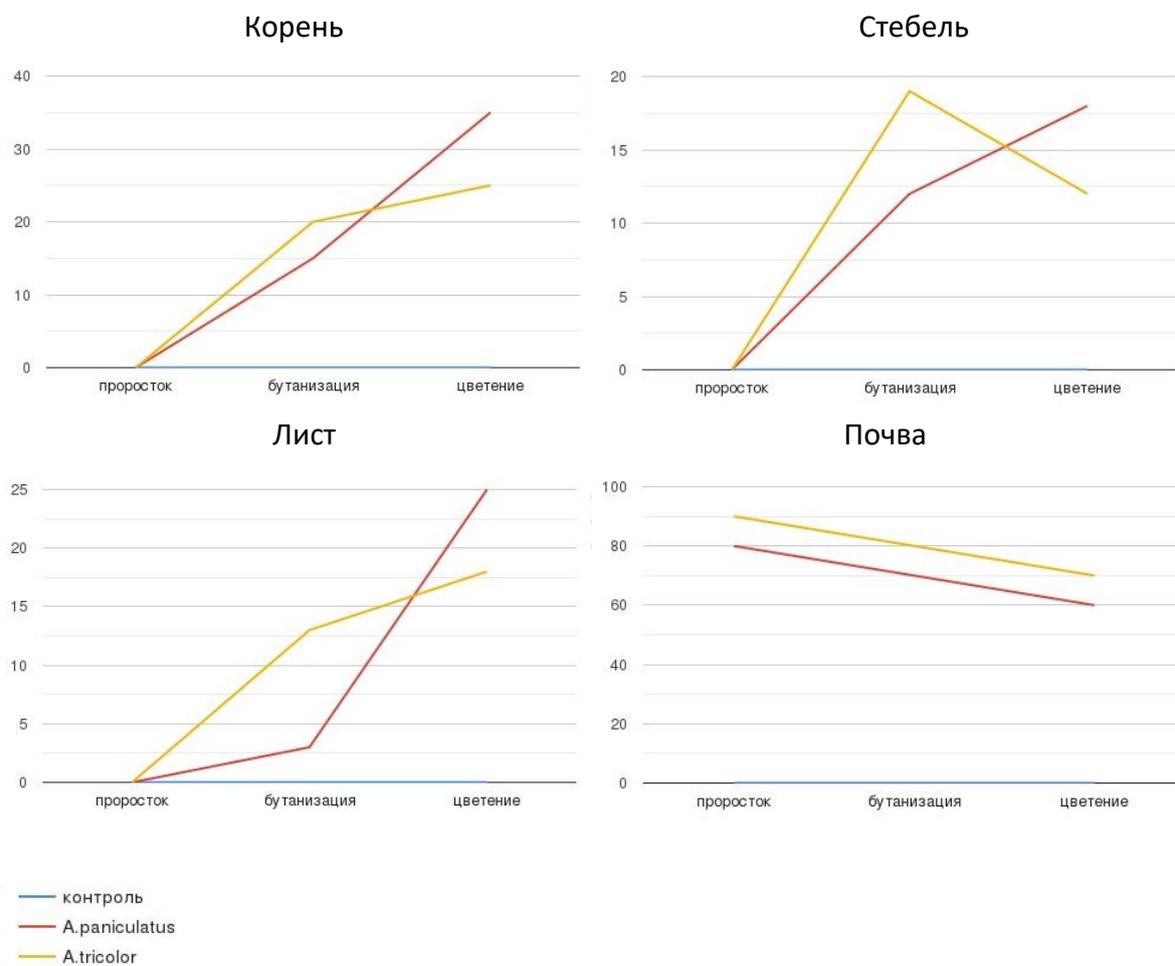


Рисунок 7 – Накопление кадмия в вегетативных органах амаранта и в почве

Видно, что фитотоксичность кадмия проявляется постепенно. В связи с увеличением дозы кадмия приводит к нарушению биохимических реакций в клетке, участвующих в метаболизме растения, и влияет на остановку процесса роста.

В исследованиях большая доза кадмия подавляла рост корней. Устойчивость *A. paniculatus* к морфологическим признакам и накоплению кадмия выше, чем у *A. tricolor*. Было замечено, что поглощение кадмия *A. paniculatus* в фазе вегетации и бутонизации является интенсивным. Во время цветения накопление металла прекращается. На рисунке показано влияние 5 г кадмия в почве на фазу развития растения. При начальной концентрации кадмия в почве 100 мг\кг, при последней фазе цветения содержание в почве *A. paniculatus* уменьшается вдвое.

В вегетативном исследовании изучалось влияние тяжелых металлов (Cu, Cd, Zn) в различных дозах на рост и развитие двух видов амаранта. Это исследование имеет несколько отличий от выращивания в полевых условиях: во - первых, постоянно на протяжении всего периода исследования будет поддерживаться равномерное содержание влаги и температуры почвы: во - вторых, все корни могут быть обеспечены одной и той же почвой, в

естественных условиях она имеет разную структуру, а последнее позволяет изучать влияние тяжелых металлов в различных заранее определенных концентрациях. Способность растений накапливать тяжелые металлы сильно различается. Данные о распространении тяжелых металлов в тканях и органах растений противоречивы. Некоторые авторы говорят, что тяжелые металлы накапливаются в органах растений, другие говорят, что они накапливаются в их корнях. Часто растения отличаются тем, что в подземных органах (листьях, стеблях, семенах) накапливаются тяжелые металлы. Соотношение концентрации элементов в органах и тканях растений варьируется в зависимости от вида растения.

Накопление тяжелых металлов в растениях происходит по-разному, в зависимости от того, как растение состоит из химических элементов: генетического и экологического фактора. Экологический фактор влияет на питательную среду при попадании подвижных форм тяжелых металлов. В современной научной практике до конца не изучен генетический потенциал распространения и накопления тяжелых металлов в семействах растений. Как фитоочиститель почвы, в очистке экологии областей, загрязненных тяжелыми металлами, интенсивно развиваются исследования селекции семян.

Высокое содержание в почве кадмия и цинка в вегетативных органах амаранта свидетельствует о акропотическом характере (от корней до надземных частей). Все исследуемые тяжелые металлы в высоких дозах накапливались в надземных частях растения по сравнению с его корнями. Это связано с защитной способностью корневой системы растения.

### **3.3 Способность амаранта образовывать каллусы и влияние фитогормонов в зависимости от происхождения эксплантата**

В результате многочисленных исследований, проведенных в процессе роста тканей клеток амаранта и каллусогенеза, было получено большое разнообразие каллусов из-за их различных морфологических признаков. Для исследования были получены четыре типа каллусных тканей из-за их морфологических особенностей. морфогенные каллуса, отобранные из двух видов амаранта, высаживали в жидкую среду МС и выращивали при комнатной температуре ( $20^{\circ}\text{C}$ ) в колебаниях со скоростью 120 оборотов\мин. Через две недели мы заметили появление многоклеточных комплексов, которые были перенесены в питательную среду с различными концентрациями цинка и кадмия. Эти культуры отслеживаются и просматриваются до тех пор, пока не появятся морфогенные линии каллуса. После получения морфогенных каллусов его помещают в среду для получения регенерата. Полученные регенеранты мало чем отличались от исходных побегов. К сожалению, мы не смогли сделать вывод из-за самоклонального изменения условий выращивания (просто теплого) для проведения всей фазы развития растения-регенеранта.

Соматический эмбриогенез ткани амаранта. Три вида амаранта для изучения; были получены Метельчатый красный, *A. argentinus*, *A. paniculatus*. Чтобы получить от них ростки, в случае с фитотроном цветок высаживают в посадочную емкость. Через 3-4 недели мы посмотрели, появились ли сожаления и 1 лист. После появления 5-6 листьев мы обрезали растение для выращивания *in vitro*.

Ростки промывали мыльным раствором 5-7 минут, затем промывали проточной водой 1-2 минуты. Для стерилизации помещают в стерилизованный стакан на 3 минуты в 1% - ный раствор сулема (алмаза), затем ополаскивают стерильной дистиллированной водой около 15 минут 3 раза. Для получения каллусов побеги срезаем скальпелем, а листья высаживаем в центр Мурасиге - Скуг (МС) с добавлением 30% сахарозы, 2-5 мг/л 2,4-Д (дихлорфеноксисукусной кислоты) фитогармона. Материалы, посаженные в чашку Петри, выдерживаем в термостате 24 -26 °С 2 - 3 недели, образовавшиеся каллусы высаживаем в другую питательную среду нового МС.

Метельчатый красный, *A. Argentinus* показал, что способен образовывать высокие каллусы – 80 - 86 %. *A. Paniculatus* указывает на образование каллуса среднего размера.

Наблюдается рост биомассы каллусов всех семян амаранта.

Таблица 2 – Количество образовавшихся каллусов

№	Название амаранта	Материал, посаженный в питательную среду (количество)	Образовавшиеся каллусы (количество)	Образовавшиеся каллусы, %
1	«Метельчатый красный»	100	86	86,0
2	« <i>A. argentes</i> »	100	90	90,0
3	« <i>A. paniculatus</i> »	100	80	80,0



Рисунок 8 – Морфогенный каллус амаранта

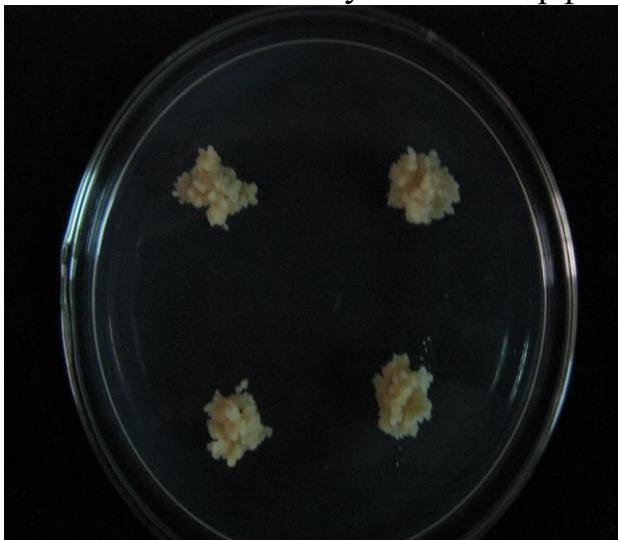


Рисунок 9 – Неморфогенный каллус амаранта

Таблица 3 – Рост биомассы морфогенных каллусных культур амаранта

Название семян	Масса каллусов, мг 1-я посадка	Масса каллусов, мг 2-я посадка	Масса каллусов, мг 3-я посадка
«Метельчатый красный»	143,6± 0,11	193,6 ± 0,12	265,1 ± 0,12
« <i>A. argentinius.</i> »	162,3± 0,13	215,4 ± 0,09	341,6 ± 0,1
« <i>A. paniculatus.</i> »	126,1±0,12	175,1 ± 0,1	217,1 ± 0,13

Суспензионная культура получена из морфогенного каллуса рода амаранта *A. argentinius*. Для получения суспензионной культуры мы использовали аминокислотную (АА) среду, в которую добавили 2 мг/мл 2,4-Д фитогормона. В результате 14-дневного окультуривания мы получили кривую роста суспензии

амаранта. В фазе экспоненциального роста суспензионные культуральные клетки амаранта могут удвоиться примерно за 1 день.

Полученные каллусы высаживали в питательную среду Мурасиге - Скуг (МС) с добавлением фитогормонов зеатина (0,5 мл/л), ИУК (индолил 3 - уксусная кислота, 0,5 мл/л). В настоящее время каллусы находятся на стадии регенерации.

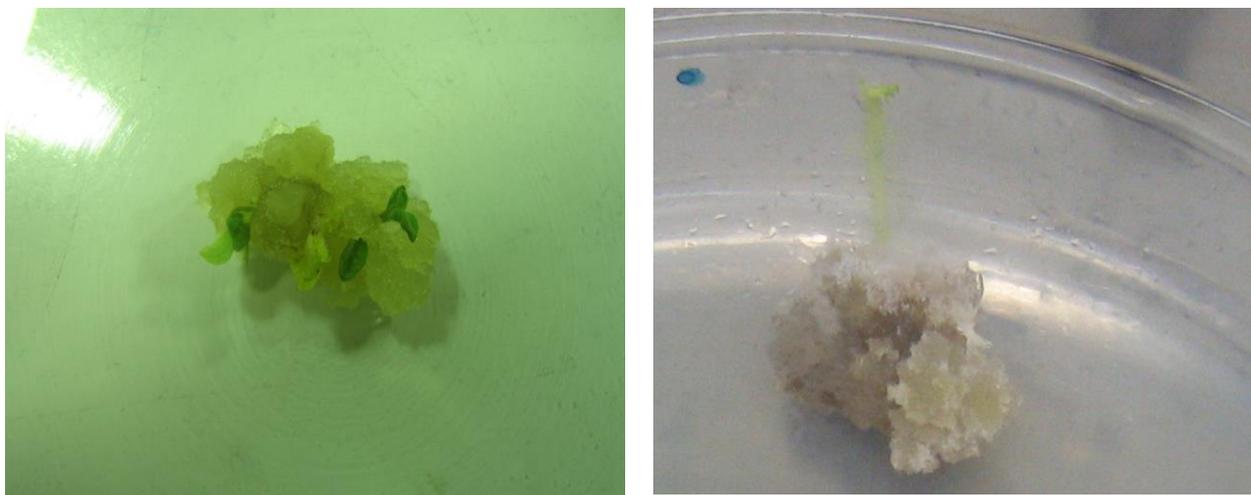


Рисунок 10 – Регенерация растений из каллусов амаранта

Таким образом, морфогенные каллусы, полученные из линий амаранта, успешно использовались для получения суспензионной культуры, в дальнейшем использовались для получения устойчивых к тяжелым металлам растительных форм в клеточной селекции и для экспериментов по генетической трансформации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате фенологического контроля стало ясно, что все изученные виды амаранта в нормальных условиях (время посадки, температура, влажность и т. д.) могут получить полностью развитые плоды, проведя всю фазу своего развития. По динамике с продолжительностью фенофазы не было различий у всех видов амаранта. Специфичность фенологических свойств амаранта обусловлена длительностью периода бутонизации (27-35 дней) и периода цветения (49-52 дня). Продолжительность вегетационного периода у всех видов составляла 120-145 дней. В период вегетации и бутонизации наблюдается интенсивный рост.

У изученных видов реакция побегов разного возраста на металлы была одинаковой: при высоких концентрациях металлов рост надземных и подземных органов растения подавлялся, а биомасса снижалась. Было замечено, что надземные органы побегов амаранта более устойчивы к ионам металлов по сравнению с корнями.

Исследование, проведенное в воде, показало, что накопление ионов тяжелых металлов различается. *A.tricolor* способен накапливать олово в высоких концентрациях и, как правило, устойчив к этому металлу. *A.paniculatus* устойчив к кадмию с медью. Исследования почвы показали, что растения способны накапливать тяжелые металлы в фазе вегетации и бутонизации. При проведении всех исследований было замечено, что в период цветения накапливается меньше тяжелых металлов. Накопление высокой дозы металлической олова, меди и кадмия в почве в вегетативных органах амаранта демонстрирует акропетальный характер (от корней до надземных отделов). Всем изученным тяжелым металлам установлена известная закономерность:

- увеличение накопления тяжелых металлов в надземных частях растения при поступлении загрязняющих веществ в верхнем количестве по сравнению с корнями;

- во всех вариантах исследования способность тяжелых металлов накапливаться в корнях и надземных частях растения может быть продемонстрирована следующим образом: олово < кадмий < медь;

- было обнаружено, что *A.tricolor* устойчив к высоким концентрациям олова, а *A.paniculatus* устойчив к кадмию, как показало исследование, проведенное в воде. В результате многочисленных исследований процесса каллусогенеза и роста тканей были получены различные каллусы, отличающиеся друг от друга своими морфологическими особенностями. Для проведения работ были выбраны четыре различных типа каллусов в морфологически специфических связях. В нашей исследовательской работе развитие процесса соматического эмбриогенеза осуществлялось двумя разными способами; 1 - прямой эмбриогенез; 2 – не прямой (косвенный) эмбриогенез. В обоих случаях было получено регенеративное растение. Эта система может быть применена к исследованиям агробактерической и баллистической трансформации.

## Охрана труда и безопасность жизнедеятельности

Выполнение данного раздела производится в соответствии с Законом Республики Казахстан «О труде», требованиями противопожарной и техники безопасности. Особое внимание уделяется отдельным технологическим процессам, вопросам освещения, местной и общей вентиляции и т.д., которые могут быть вредны для здоровья человека.

В разделе техники безопасности производится расчет по защите электрических установок, следует рассмотреть описание систем голосовой и световой сигнализации, описание вопросов о излучении, шуме, колебаниях, голосовом замыкании, использование наружных резервуаров для пожаротушения, автоматических систем пожаротушения внутри и др.

Охрана труда - система правовых актов и соответствующие ей организационные, технические и гигиенические меры по сохранению работоспособности и здоровья человека в процессе труда. Он охватывает все виды хозяйственной деятельности и предприятий, независимо от формы собственности.

Гарантии прав на безопасность и охрану труда при приеме на работу.

Условия индивидуальных трудовых договоров должны соответствовать требованиям нормативных правовых актов Республики Казахстан о безопасности и охране труда.

Прием граждан на работу, негативно влияющий на состояние их здоровья, запрещается.

В индивидуальном трудовом договоре, включая опасные и вредные факторы, должны быть указаны достоверные характеристики рабочего места, льготы и компенсации за работу в таких условиях, предусмотренных законами Республики Казахстан о безопасности и охране труда и коллективным договором.

При приеме на работу с вредными и опасными условиями труда работодатель обязан предупредить работника о возможности возникновения профессионального заболевания.

### 4.2 Характеристика потенциально опасных и вредных факторов в биологической лаборатории

Исследования селекционных, генетических параметров хвостатых овец мясо-жирового направления проводятся в биотехнологической лаборатории. Одним из факторов риска, обнаруженных в этой лаборатории, являются возбудители инфекционных заболеваний (бруцеллез), которые передаются от животных к человеку.

Бруцеллез передается человеку через болезнетворные микроорганизмы домашних животных (крупный рогатый скот, овцы, козы свиньи) – бруцеллы. Люди заражаются этим заболеванием при лечении, осмотре больных домашних животных и при употреблении в пищу мяса или молочных продуктов больных животных.

Также в лаборатории это заболевание может быть диагностировано при проведении исследований с животными. Поэтому в этих биологических лабораториях должен быть установлен санитарный порядок.

Пробиотики - это живые микроорганизмы, которые оказывают правильное влияние на организм животного происхождения.

Термин "пробиотик" предназначен для обозначения ферментации их Рихардом и небольшими организмами. Паркером и был предложен для производства продуктов с антагонистической активностью с упором на патогенную микрофлору. Но впервые русский биолог Илья рассказал миру об этом явлении, о явлениях антагонизма в области исследования.

Пробиотики широко затрагивают ряд проблем в ветеринарии, начиная с коррекции биоценоза кишечника и распространяясь на иммуноферментную, гормональную и ферментную коррекцию основных систем. Из тех, кто имеет большое количество пробиотиков, можно сделать вывод, что они достаточно хорошо справляются с проблемой. Для выращивания пробиотиков в условиях современной промышленной технологии надежными средствами служат средства защиты кишечника от колонизации патогенов микроорганизмами, исходящими от животных. Кроме того, лекарства, попавшие под термин «пробиотик», используются для стимуляции процессов - и усвоения кормов, роста и развития животных, витаминов, стимуляций иммунной системы, регуляции микробиоценоза, племенных путей и кожных покровов.

Важное место среди основных факторов питания занимает микрофлора пищеварительного тракта. Задача организации питания животных - регулирование физиологических и морфологических адаптаций пищеварительной системы и микробиологических процессов пищеварения к эффективному использованию кормов для надлежащего обеспечения условий. Какие пробиотики используются в качестве микробиологической добавки они являются наиболее активными лекарствами. Пробиотик используется при системном питании. В питании также используется пробиотик, который поступает от домашнего скота.

Они необходимы, особенно для того, чтобы микрофлора пищеварительного тракта оказывала влияние большого количества факторов, которые могут эффективно нарушаться в рационах сельскохозяйственных животных в гармоничном соотношении: изменяющиеся корма, переноски, концентрации поголовья на единицу площади, выходящие из различных контактных животных, погодные изменения, лечение антибиотиками. Нарушение гармоничного соотношения микрофлоры пищеварительного тракта приводит к уменьшению всасывания съедобных веществ, раздражению стенок кишечника, усиленной перистальтике, уменьшению глотания воды, поносу и другим последствиям.

Применение пробиотика в питании создает условия для развития полезной микрофлоры у животных (нормофлора), которая прикрепляется к эпителиальной сетке желудочно - кишечного тракта и желудка и успешно борется с кишечными,

патогенными мелкими организмами, поступающими из внешней среды. Кроме того, нормофлора-токсины, принимает активное участие в синтезе витаминов, Д, Е, аминокислот, благодаря чему улучшается использование организмом пищи. Пробиотик животного происхождения создан на основе нормированной микрофлоры пищеварительного тракта, не имеет негативных гигиенических последствий, то есть экологически безвреден. Для получения пробиотика используются сообщества мелких организмов, таких как кислое молоко, пропион-горькие, ацедофильные бактерии, бифидобактерии, фекальные стрептококки, кишечные палочки, целлюлолитические, синтезирующие бактерии каротин, бактеофаги, простейшие, шовные.

Механизм действия пробиотика основан на конкуренции за съедобное вещество и следует за местом обитания в эпителии пищеварительного тракта. Эпителий, покрываемый тонким слоем полезных бактерий, конкурирует с потенциально патогенными бактериями и препятствует их прикреплению к пищеварительному просвету эпителия: обеспечивает стабильность кисломолочного продукта и летающих жирных кислот в желудочно-кишечном тракте; гармоничные соотношения микрофлоры пищеварительного тракта в раннем образовании. Применение пробиотик-препаратов в виде малых организмов-продуцентов биологически активных веществ, развитие способностей и сопровождение нормофлоры ЖКТ, исходящих от животных, открывает принципиально новые пути обеспечения организма животными этими веществами.

Именно с этой целью в дипломной работе речь идет о ассоциативном исследовании бактерий сыворотки для получения пробиотика.

Пробиотики - это препараты живых бактерий-культур, предназначенные для коррекции микрофлоры животных и сопутствующего лечения заболеваний. В последние годы слово пробиотик используется в нескольких разных значениях. Он был использован для описания первых субстанций, продуцируемый только одним простым, стимулируется другим порогом роста, но вечернее приложение он использовал для описания корма, для создания полезного мощного эффекта, исходящего от домашнего скота, для создания его влияния на микрофлору кишечника. Но последнее определение понятия пробиотик как «живо-кормовая добавка, кишечная-то, что выводится из скота путем его улучшения – благотворно действует на крестьянина». Пробиотик, в отличие от антибиотика, не проявляет неблагоприятных воздействий на нормальную микрофлору, поэтому широко используется для их защиты и повышения устойчивости организма к инфекции пробиотик лечения дисбактериоза имеет важную особенность в их способности, пищеварение и стимуляция. Сухие формы пробиотиков теперь высоко ценятся для высвобождения, высушенные небольшие организмы лиофильный держатель. Это понятие, прежде всего, связано с торговым вниманием, удобством переноски и сохранностью таких видов лекарств. Сухой препарат, как правило, имеет большой срок хранения, температурный режим не требует строгого

соблюдения. Но настоящий клинический сильный эффект от использования пробиотика с гораздо меньшим количеством сухих жидкостей. Жидкая форма пробиотика предполагает стабильную активность мелких организмов, что требует соблюдения четких правил содержания входящих в ее состав, либо хранения таких препаратов. Кроме того, жидкости с пробиотиками имеют большие преимущества перед сухими видами. В составе бактерия сохраняет все свои полезные свойства с пробиотиком. Они активно конкурируют с патогенной флорой сразу после энтерального контакта среды. Кроме того, жидкости с пробиотиками содержат другие их продукты жизнедеятельности живых мелких организмов, формирующих среду в кишечнике, благоприятную для представителей нормофлоры, и уничтожают патогенные мелкие организмы. Пробиотики широко затрагивают ряд проблем в ветеринарии, начиная с коррекции биоценоза кишечника и распространяясь на иммуноферментную, гормональную и ферментную коррекцию основных систем. Есть широкое число тех, кто пробиотик домашний скот лекарства.

В этой проблеме основное внимание уделяется их обработке. В наше время для выращивания пробиотиков в промышленных технологических условиях надежными средствами служат кишечные средства защиты от колонизации патогенов микроорганизмами, исходящими от животных.

Кроме того, лекарства, термин «пробиотик», используется для стимуляции процессов и ассимиляции кормов, роста и развития животных, стимуляции витаминно-иммунной системы, регуляции микробиоценозы, племенных путей и кожных покровов. Штамм пробиотик-специфический штамм бактерий, вырабатываемых из кислого молока, колонизирует кишечный эпителий и стимулирует иммунную систему, либо позволяет улучшить сопротивляемость организма, сосредоточив внимание на инфекциях. Снижение рН органической кислоты в желудке и развитие патогенных бактерий животного происхождения в кишечнике, равно как и кишечная палочка, сальмонелла и энтеробактерин отличаются.

#### 4.3 Правила обращения с кислотами и меры предосторожности

1. Серная кислота. Серная кислота сильно обжигает кожу при попадании на нее. При попадании серной кислоты на кожу или одежду ее следует промыть большим количеством воды или 0,5% - ным раствором соды. Серную кислоту нужно вливать в воду, а не наоборот.

2 Соляная кислота. В воздухе поднимается дым. Сильно раздражает верхние дыхательные пути из-за выделения хлористого водорода.

При работе с кислотами важно не проливать кислоту и не прикасаться к коже и глазам. Нужно быть очень осторожным, чтобы не обжечься и не отравиться. При использовании стекла, содержащего кислоту внутри, на каждом стекле должно быть четко написано название кислоты. При заливке кислоты из стекла необходимо наливать с противоположной стороны, чтобы не повредить этикетку. При работе с кислотой следует использовать защитные очки.

#### 4.4 Основные правила техники безопасности в биологической лаборатории

1. При работе в лаборатории необходимо соблюдать тишину, чистоту, последовательность и правила техники безопасности.

2. Только приточно - вытяжные вентиляторы подходят для работы, с вытяжными шкафами с системой очистки воздуха, рабочей одеждой( халат, фартук, перчатки), средствами индивидуального применения (перчатки, очки, предохранительные газоопасные средства), нейтрализующими веществами ,средствами пожаротушения (огнетушитель, войлок, асбестовое покрытие и др.) и работать разрешается только в химических лабораториях, оборудованных аптечкой и комплектом необходимых медикаментов.

3. Для обеспечения чистоты, безопасности рабочие места и вытяжные шкафы не должны очищаться реактивами, химической посудой, приборами и лабораторным оборудованием, не применяемыми при выполнении данной работы.

4. Все операции по выделению или засолению токсичных, горючих или взрывоопасных веществ необходимо проводить при соблюдении всех мер предосторожности, под шкафом, где хорошо работает система впуска и выпуска воздуха.

5. Щелочи, кислоты и другие едкие и ядовитые жидкости следует извлекать пипеткой (присоской) с помощью химической груши. Пипетке не рекомендуется высасывать едкие и ядовитые вещества ртом, так как при этом ротовая полость может подвергнуться химическим ожогам или отравиться. При встряхивании растворов в колбах или пробирках их следует закупоривать специальной пробкой, а не пальцем.

6. При взвешивании сыпучих веществ их следует помещать непосредственно в чашу весов. Для этого следует использовать специальное часовое стекло или посуду, химические вещества нельзя оставлять на весах.

7. Оставление без присмотра приборов, на которых ведутся работы, не допускается. Работы с опасными химическими веществами следует выполнять под руководством руководителя работ.

8. Электрические приборы должны быть подключены к земле. Перед их запуском необходимо проконсультироваться с их преподавателями или лаборантом.

9. Перед возвращением с работы сотрудники лаборатории обязаны тщательно осмотреть свое рабочее место и убрать его, убрать опасные для уборки предметы на специально оборудованное место. Газовые, электрические и другие приборы необходимо выключить, остановить протекание химических реакций, отключить энергию и воду от источника включения огня и передать лабораторию ответственному лицу.

10. При выполнении работ по синтезу, анализу необходимо иметь в виду, что потребуется много, в том числе токсичных и опасных для горения реактивов. К токсичным веществам относятся: аммиак, сероводород, ртуть соли, шавелевая кислота и ее соли, бром (пары), циан.

- с применением средств, рассчитанных на взрывное давление;

- аварийные установки сброса давления при взрывах, с защитой от загрязнения аппаратов: с использованием быстродействующих щупов с обратными клапанами;

- с применением систем активного уничтожения зарослей.

Меры взрывозащиты нормативно-техническими документами

использовать конкретное предприятие в процессах.

3 Требования к страхованию от взрыва. Чтобы предотвратить взрыв, сначала следует избегать среды, в которой происходит взрыв. Стадии возникновения взрывоопасного пожара: процессы, проводимые процессом взрывоопасного производства;

контроль за соблюдением технологических правил пожарной безопасности, правил и норм санитарии производства, техники безопасности;

порядок организации противоаварийных, горных работ, газосберегающих работ и проведения работ в аварийных ситуациях.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Усп. совр. биол., 2013 г. Т. 115, 3. - Б. 261-275.
2. Tucker J.V. Amaranth: the once and future crop // Bioscience. 2015 y.-Vol.36, N9. - P.59 -20
3. Van Bergeijk K.E., Noordijk H., Lembrechts J., Fris-sel MJ. Influence of pH, soil type and soil organic matter content on soil-to plant transfer of radiocesium and strontium as analyzed by a nonparametric method// J. Environ. Radioact. 2016 y. V. 15. - P. 265-276.М. М. Lasat
4. Первунина Р.И. Формы кадмия в почвах и поступление его в растения// Цинк и кадмий в окружающей среде. М.: Наука, 2014 г. - Б. 83-100.
5. Пинский Д. Л. Формы соединений цинка и кадмия в естественных и загрязненных почвах //Цинк и кадмий в окружающей среде. М.: 2015 г. - Б. 74-83.
6. Генкель П. А. Физиология устойчивости растительных организмов. Физиология сельскохозяйственных растений. М., МГУ 2013, Т. 3. - Б. 87-325.
7. Коваленко О.В. Генетические аспекты морфогенеза растений// Успехи соврем. биологии. 2013 г. Т. 113. Шығ. 3. - Б. 269-285.
8. King P., Potrykus I., Thomas E. In vitro genetics of cereals. Problems and perspectives // Physiol. Veg. 2015 y, - P 381 - 399.
9. Папазян И.Д. «Культура зародышей и стеблевых узлов некоторых сортов ячменя» // Апомиксис и цитозембриология растений. Саратов 2014, - Б. 141-151.
10. Рахимбаев И.Р., Тивари Ш. «Экспериментальная гаплоидия в культуре пыльников и микроспор зерновых злаков» // с\х биология № 3 2015., - Б. 44-55.
11. Анапияев Б.Б. «Морфогенез в культуре изолированных пыльников и микроспор пшеницы» // Алматы:, 2013 г. - Б. 20.
12. Уәлиханова Г.Ж. Өсімдік биотехнологиясы. Алматы:, ЖШС «Дәуір», 2019, - Б. 51.
13. Ережепов Ә.Е., Мухамбетжанов С.К., Уәлиханова Г.Ж. Өсімдік ұлпаларын өсіру және биотехнология бойынша зертханалық жұмыстар. Алматы:, 2013 ж., - Б. 115.
14. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей и клеток в физиологии и биохимии растений. Киев, 2013 г., - Б. 488.
15. Ладонин Д.В., Марголина С.Е. Взаимодействие гуминовых кислот с тяжелыми металлами // Почвоведение. 2017 г. № 7.- Б. 806 - 811.
16. Knecht J., Dillen M., Schat H. Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant vulgaris // Plant Physiol. -2014. - V.104. - P.255-261.
17. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационных методов. Москва:, 2013 г.- Б. 46-68.

18. Битюцкий Н.П., Магницкий С.В. Содержание металлов в органах зерновки и рост корней кукурузы при прорастании // Физиол. раст.-2013 г. Т.46. №3.- Б. 495-499.
19. Fabera R.L. Aluminum toxicity in *Symplocos* at near neutral soil pH levels // *Plant Nutr.* 2014 y. Vol.2. N6. - P. 683-697.
20. Wu L., Antonovics J. Zinc and copper tolerance of *Polycarpaea spirostylis* in tissue culture // *Amer.J.Bot.* 2015 y.Vol.65. N7.- P. 268-271.
21. Stiborova M., Doubravova M., Bresinova A., Friedrich A. Effects of metals on enzyme activity in plants // *Phytosynthetica.* 2016 y. Vol.20,N4.-P. 418.
22. Steveninck R.F., Babare A. The binding of zink, but not cadmium, by fhytic acid in roots of crop plants// *Plant and soil.* 2015 y.Vol.167.-P.157-164.
23. Ильин В.Б., Гармаш П.В. ТМ в растениях. // *Агрохимия.* 2013/6.
24. 45 Касимов Н.С., Кошелева Н.Е., Самонова О.А. Подвижные формы тяжелых металлов в почвах лесостепи среднего Поволжья (опыт многофакторного регрессионного анализа) // *Почвоведение.* 2013 г. №6. - Б. 705-713.
25. Ладонин Д.В. Влияние техногенного загрязнения на фракционный состав меди и цинка в почвах // *Почвоведение.* 2014 г. № 10.- Б. 1299-1305.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТІ

**РЕЦЕНЗИЯ**

НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ  
МҰХТАРОВА ӘНЕЛ САМАТҚЫЗЫ  
6B05101 – «Биотехнология»

На тему: «Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре *in vitro*»

Выполнено:

- а) графическая часть на \_\_\_ листах.
- б) пояснительная записка на \_\_\_ страницах.

**ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ**

Дипломная работа Мұхтаровой Ә. С. представляет собой законченное исследование, состоящее из следующих ключевых разделов: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования и заключение. Проведено исследование устойчивости растений амаранта и каллусных тканей, полученных из них *in vitro*, к солевой среде. Было изучено влияние тяжелых металлов (Cd, Cu, Zn) на рост и развитие растения амарант.

В обзоре литературы были рассмотрены биологические свойства и морфогенез растения амарант.

Во втором разделе приведены данные по объекту, материалам и методике для расчетных исследований.

В разделе результаты исследования была проделана работа по изучению влияния различных концентраций тяжелых металлов на рост побегов, динамики накопления тяжелых металлов в вегетативных органах амаранта.

Дипломная работа соответствует требованиям государственного стандарта, направлению и профилю профессиональной подготовки студента.

Данная работа имеет практическую значимость, что вследствие может быть использована в биотехнологической сфере Казахстана.

Существенных недостатков работа не имеет.

**Оценка работы**

Дипломная работа соответствует предъявляемым требованиям и заслуживает оценки «отлично», Мұхтарова Әнел Саматқызы достойна степени бакалавра по специальности – 6B05101 «Биотехнология»

**Рецензент**

АТУ, кафедра «Пищевая биотехнология»  
к. б.н., асс. профессор



## Отзыв руководителя

на дипломную работу Мұхтаровой Ә.С.

студенки кафедры ХиБИ

специальность: Биотехнология

«Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре *in vitro*»

Основные замечания по дипломной работе и характеристика студента

Темой дипломной работы Мұхтаровой Ә.С. являются «Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре *in vitro*».

Объектами исследования являются два вида амаранта, выращенные в пластмассовых емкостях размером 15×13 см и полученные с полей (*A. paniculatus* и *A. tricolor*). Почва, в которой проводится исследование (рН 6,3) в виде соли:  $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  (50,75, 100 мг/кг);  $CuSO_4 \times H_2O \times 5H_2O$  (75, 100, 150 мг/кг);  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  (150, 225, 300 мг/кг), вода и удобрение. Для контроля роста растения высаживают в почву без добавления соли и металла. Исследование повторялось три раза.

Вегетационное исследование длилось от 125 до 145 дней. Для изучения транспорта и локализации тяжелых металлов с фиксацией растения и исследуемого материала (корень, стебель, лист) проводили в различные вегетационные периоды (на побегах). В то же время были взяты образцы для определения накопления тяжелых металлов в почве.

Культивирование эксплантантов амаранта в питательной среде Мурасиге - Скотт (*A. tricolor*, *A. paniculatus*). Два вида амаранта для культивирования *A. tricolor*, *A. paniculatus* получены листья эксплантантов. Семена замачивают на 3-5 минут в 70% этаноле для стерилизации. Стерилизованные материалы выращивают в пробирке в воде, дистиллированной в бумажном пузыре. Растение выращивают для получения эксплантантов до 10 дней. Эксплантант высаживали в питательную среду Мурасиге - Скотт (МС). Мы культивировали каллусы при 28°С, которые пересаживали каждые 4 недели в новую питательную среду. Первый интенсивный рост каллусов наблюдался через 30 дней после культивирования.

Исследование, проведенное в воде, показало, что накопление ионов тяжелых металлов различается. *A. tricolor* способен накапливать олово в высоких концентрациях и, как правило, устойчив к этому металлу. *A. paniculatus* устойчив к кадмию с медью.

При проведении исследований Мұхтарова Әнел зарекомендовала себя с положительной стороны, показала хорошие теоретические знания и практические навыки по биотехнологии.

### Оценка дипломной работы

Дипломная работа Мұхтаровой Ә.С. выполнена на высоком научном уровне. В целом полно и точно раскрыла тему дипломной работы. Недостатков обнаружено не было. Работа допускается к защите

Рекомендуемая оценка – «отлично»

Научный руководитель:  
к.с.-х.н., ас. профессор



Каташева А.Ч.  
2023 г.



## Метаданные

Название

Изучение регенерации и морфогенеза амаранта в культуре in vitro.docx

Автор

Мухтарова Өнел Саматқызы

Научный руководитель / Эксперт

Алма Каташева

Подразделение

ИГИНГД

## Список возможных попыток манипуляций с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще, характер технических ошибок при конвертации документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей ответственности. В случае возникновения вопросов, просим обращаться в нашу службу поддержки.

Замена букв		1
Интервалы		0
Микропробелы		6
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)	a	10

## Объем найденных подобию

Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



25

Длина фразы для коэффициента подобию 2



8903

Количество слов



67472

Количество символов

## Подобия по списку источников

Посмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП №2 (выделенные жирным шрифтом). Используйте ссылку «Обозначить фрагмент» и обратите внимание на то, являются ли выделенные фрагменты повторяющимися короткими фразами, разбросанными в документе (совпадающие сходства), многочисленными короткими фразами расположенные рядом друг с другом (парафразирование) или обширными фрагментами без указания источника ("криптоцитаты").

### 10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	<a href="https://forum.say7.info/topic63868.html">https://forum.say7.info/topic63868.html</a>	17	0.19 %
2	<a href="https://nauchkor.ru/pubs/issledovanie-sorbtsionnyh-svoystv-vo-loknisto-poristogo-sorbenta-na-osnove-biopolimerov-i-primeneniye-ih-dlya-glubokoy-ochistki-vod-ot-tyazhelyh-metallov-60cf2cf4e4dde50001565b31">https://nauchkor.ru/pubs/issledovanie-sorbtsionnyh-svoystv-vo-loknisto-poristogo-sorbenta-na-osnove-biopolimerov-i-primeneniye-ih-dlya-glubokoy-ochistki-vod-ot-tyazhelyh-metallov-60cf2cf4e4dde50001565b31</a>	12	0.13 %
3	<a href="https://orensau.ru/ru/prochiedokumenty/doc_view/1697--28">https://orensau.ru/ru/prochiedokumenty/doc_view/1697--28</a>	12	0.13 %

4	Мycoplasma Gallisepticum өнеркәсіптік кәсіпорындарда биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету 5/2/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	12	0.13 %
5	<a href="http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm">http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm</a>	11	0.12 %
6	«Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии Pseudomonas aeruginosa» 5/6/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	10	0.11 %
7	<a href="http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm">http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm</a>	9	0.10 %
8	<a href="http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm">http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm</a>	9	0.10 %
9	«Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии Pseudomonas aeruginosa» 5/6/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	6	0.07 %
10	Мycoplasma Gallisepticum өнеркәсіптік кәсіпорындарда биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету 5/2/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	6	0.07 %

#### из базы данных RefBooks (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИФНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

#### из домашней базы данных (0.38 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИФНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	Мycoplasma Gallisepticum өнеркәсіптік кәсіпорындарда биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету 5/2/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	18 (2)	0.20 %
2	«Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии Pseudomonas aeruginosa» 5/6/2019 Satbayev University (ИХиБТ)	16 (2)	0.18 %

#### из программы обмена базами данных (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИФНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

#### из интернета (0.84 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИФНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	<a href="http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm">http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell5_2.htm</a>	34 (4)	0.38 %
2	<a href="https://forum.say7.info/topic63868.html">https://forum.say7.info/topic63868.html</a>	17 (1)	0.19 %
3	<a href="https://orensau.ru/ru/prochiedokumenty/doc_view/1697--28">https://orensau.ru/ru/prochiedokumenty/doc_view/1697--28</a>	12 (1)	0.13 %

4

<https://nauchkor.ru/pubs/issledovanie-sorbtsionnyh-svoystv-vochnisto-poristogo-sorbenta-na-osnove-biopolimerov-i-primenenie-ih-dlya-glubokoy-ochistki-vod-ot-tyazhelyh-metallov-60cf2cf4e4dde50001565b31>

12 (1)

0.13 %

### Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

---

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)