

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрябин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Влияние криоконсервации на выживаемость комплекса аутоштаммов лактобактерий при хранении и процессах биотехнологического масштабирования.

М.А. Кириленко, О.Ю. Кузнецов, Ж.М. Дмитриева 5

Литические и сорбционные свойства экспериментальной смеси бактериофаг-хитозан.

*М.В. Овчинникова, Г.И. Коровкина, О.С. Зинина, В.В. Рогожин,
Т.Ю. Кириллова, А.К. Никифоров, А.К. Адамов* 11

Изучение избирательной цитотоксичности метаболита *Trichoderma asperellum* F-1087 на раковой клеточной линии человека.

*Л.М. Тимербулатова, Рин.С. Мухаммадиев, Риш.С. Мухаммадиев,
В.В. Бирюля, А.А. Набатов, Т.В. Багаева* 17

Возможности информационных технологий для прогноза токсичности приоритетных загрязняющих веществ водных объектов в системе оценки экологических рисков.

М.А. Козлова 22

Исследование процесса дефосфатации сточных вод с использованием фосфатаккумулялирующих бактерий.

А.Р. Хабибуллина, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин, Й.В. Кобелева 28

Совместное спектрофотометрическое определение амлодипина, розувастатина и лизиноприла в лекарственном препарате.

Т.С. Кырова, Ю.Б. Ельчищева 32

Метод диагностики глиом по уровню экспрессии микроРНК-21.

Б. Селлами, И.Ю. Сабурова, Д.О. Виноходов, А.Ф. Гурчин, Р.Ю. Селиверстов 39

Иммунодетекция и редокс-состояние альтернативной оксидазы в листьях *Arabidopsis thaliana* с разным уровнем экспрессии АОХ1а. Эксперимент с воздействием УФ-В.

Е.В. Гармаш, К.В. Ермолина, М.В. Кырнышева 43

Подледное цветение фитопланктона в Можайском водохранилище.

О.Н. Ерина, В.В. Пуклаков, Д.И. Соколов, А.В. Гончаров 49

Биологические свойства бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis*.

А.О. Кочеткова, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова 55

Хроника 60

Информация

Предстоящие мероприятия 2019 года 61

Правила для авторов 62

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

The effect of cryopreservation on the survival of a complex of lactic acid bacterial autostrains during storage and biotechnological scaling processes.

M.A. Kirilenko, O.Yu. Kuznetsov, J.M. Dmitrieva 5

Lytic and sorption properties of the experimental mixture of bacteriophage-chitosan.

M.V. Ovchinnikova, G.I. Korovkina, O.S. Zinina, V.V. Rogozhin, T.Yu. Kirillova, A.K. Nikiiforov, A.K. Adamov 11

The study of the selective cytotoxicity of the metabolite *Trichoderma asperellum* F-1087 in a human cancer cell line.

L.M. Timerbulatova, Rin.S. Muhammadiev, Rish.S. Muhammadiev, V.V. Biryulya, A.A. Nabatov, T.V. Bagaeva 17

Possibilities of information technology for forecast the toxicity of priority pollutants of water bodies in the system of environmental risk assessment.

M.A. Kozlova 22

Investigation of dephosphatation of wastewater using phosphate-accumulating bacteria.

A.R. Khabibullina, T.V. Vdovina, A.S. Sirotkin, Y.V. Kobeleva 28

Joint spectrophotometric determination of amlodipine, rosuvastatin and lyzinopryl in the medicinal preparation.

T.S. Kyrova, Yu.B. Ivantsov 32

Glioma diagnostic method at microRNA-21 expression level.

B. Sellami, I.Yu. Saburova, D.O. Vinokhodov, A.F. Gurchin, R.Yu. Seliverstov 39

Immunodetection and redox state of alternative oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with modified level of AOX1a expression. Experiment with UV-B impact.

E.V. Garmash, K.V. Ermolina, M.V. Kyrnysheva 43

Subglacial phytoplankton blooms in the Mozhaisk Reservoir.

H.E. Erina, V.V. Puklakov, D.I. Sokolov, A.V. Goncharov 49

Biological properties of bacteriophages *Yersinia pseudotuberculosis*.

A.O. Kochetkova, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova 55

The chronicle 60

The information

Forthcoming actions 2019 61

Rules for authors 62

К читателям

Второй номер журнала за 2019 год открывается работой Кириленко М.А. с соавторами «Влияние криоконсервации на выживаемость комплекса аутоштаммов лактобактерий при хранении и процессах биотехнологического масштабирования» (Ивановская государственная медицинская академия). В ней решена задача масштабирования штаммов в реальном биотехнологическом процессе — производстве готового молочнокислого продукта,

В следующей статье — Овчинникова М.В. и др. «Литические и сорбционные свойства экспериментальной смеси бактериофаг-хитозан» (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов), — предпринята попытка на основе исследования взаимодействия бактериофага и указанного полимера сконструировать в перспективе новый препарат для лечения и профилактики острых кишечных инфекций, в том числе холеры. В результате было установлено, что 0,5%-ная концентрация хитозана с размером частиц 0,1–0,3 мкм обеспечивает возможность литического эффекта бактериофага. Показанный концентрационный оптимум может послужить отправной точкой для дальнейших экспериментов.

Затем помещены статьи по разнообразной тематике, отображаемой в нашем журнале. Так, в работе Темирбулатовой Л.М. с коллегами из нескольких учреждений г. Казани была изучена избирательная цитотоксичность метаболита *Trichoderma asperellum* F-1087 на раковой клеточной линии человека. Благодаря исследованию Козловой М.А. из Института водных проблем РАН (Москва) «Возможности информационных технологий для прогноза токсичности приоритетных загрязняющих веществ водных объектов в системе оценки экологических рисков» предложен достаточно эффективный способ первичной оценки опасных свойств органических загрязнителей водной среды.

Работа Хабибуллиной А.Р. и др. «Исследование дефосфатации сточных вод с использованием фосфатаккумулирующих бактерий» (Казанский национальный исследовательский университет) содержит описание сравнительной характеристики дефосфатирующей способности изолятов из активного ила очистных сооружений. Объектом исследования послужили фотоаккумулирующие микроорганизмы, относящиеся к родам *Acinetobacter* и *Pseudomonas*.

В исследовании Кыровой Т.С., Ельчищевой Ю.Б. (Пермский государственный национальный исследовательский университет) определялось содержание трех действующих компонентов (амлодипин, лизинопринол, розувастатин) в комбинированном лекарственном препарате «Эквامر». При этом авторами был разработан собственный метод анализа, основанный на спектрофотометрии. Такой подход позволил им достичь достаточно высокой точности измерения с относительной ошибкой менее 5%.

В статье Селлами Б. и др. «Метод диагностики глиом по уровню экспрессии микроРНК-21», подготовленной исследователями из нескольких учреждений г. Санкт-Петербурга был осуществлен поиск наиболее адекватных биомаркеров в онкодиагностике. Применялся метод определения экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови больных глиомой и были получены убедительные факты.

Гармаш Е.В. и др. (Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар) с использованием метода Вестерн-блоттинга исследовали содержание белка альтернативной оксидазы (АОХ) и его редокс-состояние в экстракте, полученном из листьев *Arabidopsis thaliana* с разным уровнем экспрессии гена *АОХ1а*, а также изучили влияние повышенной УФ-В радиации на синтез форм АОХ.

Группа сотрудников географического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Ерина О.Н. и др.) провела гидроэкологическое обследование подледного цветения фитопланктона в Можайском водохранилище, что имеет важное значение для поддержания водоохранного режима в нем.

Кочеткова А.О. с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора с помощью специально подобранных четырех индикаторных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* обнаружили шесть новых псевдотуберкулезных бактериофагов.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КОМПЛЕКСА АУТОШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ ПРИ ХРАНЕНИИ И ПРОЦЕССАХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО МАСШТАБИРОВАНИЯ

М.А. КИРИЛЕНКО*, О.Ю. КУЗНЕЦОВ, Ж.М. ДМИТРИЕВА

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново

В ходе производства молочнокислых продуктов используют закваски, восстановленные из лиофильно высушенных штаммов микроорганизмов. Часто в данном производстве используют различные виды лактобактерий. Одним из наиболее доступных методов сохранения необходимых штаммов бактерий, кроме лиофилизации, является замораживание (криоконсервирование) при определенных температурах. Поэтому возникает вопрос длительного сохранения качества и количества жизнеспособных клеток лактобактерий, засеваемых в используемое сырье при биотехнологических процессах. В работе был использован комплекс живых аутоштаммов лактобактерий, полученный от конкретного индивидуума. Данный комплекс помещали в равных объеме и количестве микроорганизмов в герметичные стерильные емкости в объеме 1 мл и замораживали при температуре -20°C . Емкости с лактобактериями, находящиеся на хранении, периодически доставали, содержимое помещали в стерильную питательную среду, а затем инкубировали в оптимальных условиях для оценки жизнеспособности. При культивировании исследуемого материала, ранее подвергнутого криоконсервированию через 48 часов, регистрируется существенный рост оптической плотности относительно первого дня культивирования (24 часа) более чем в 4 раза. После получения готового молочнокислого продукта с использованием криогенного хранения комплекса аутоштаммов лактобактерий подтверждена его жизнеспособность в условиях низкотемпературного воздействия в течение 24 месяцев.

Ключевые слова: лактобактерии, криоконсервация, масштабирование, аутопробиотический комплекс, молочнокислые продукты.

Введение

Производство молочнокислых продуктов, которые могут быть использованы для коррекции и восстановления нормальной микрофлоры кишечника при дисбактериозе, несомненно, является важным биотехнологическим процессом. Обычно на начальном этапе масштабирования в ходе производства молочнокислых продуктов используют закваски, восстановленные из лиофильно высушенных штаммов микроорганизмов, для которых повышают численность и активность клеток путем предварительного культивирования. Одним из наиболее доступных методов, кроме лиофилизации, является замораживание (криоконсервирование) при различных температурах от -20°C и до температуры жидкого азота [3, 9, 11]. Пониженная температура приводит к остановке физиологических процессов внутри клеток. Самое главное, чтобы процесс

замораживания наступил достаточно быстро и это было возможно без повреждения клеточных структур при более низких температурах [14, 16]. В то же время получение и сохранение при пониженной температуре (в процессе криозамораживания) микробных культур представляют собой существенный интерес как начальный этап в последующих биотехнологических циклах [12, 13] получения необходимых человеку пробиотических продуктов [10].

В последние годы при получении продуктов функционального питания обращается внимание на получение данных продуктов на основе молочнокислых аутопробиотических штаммов микроорганизмов (бифидобактерии, лактобактерии и др.). Чаще всего в продуктах функционального питания используют различные виды или штаммы лактобактерий, в связи с менее строгими условиями их культивирования и простотой лабораторного контроля качества конечной продукции. После выделения аутопробиотического комплекса лактобактерий от конкретного индивидуума закономерно следует этап получения готового продукта в достаточном объеме для последующего использования. В данном случае возникает чрезвычайно важный вопрос длительного предварительного сохранения качества и количества жизнеспособных клеток

© 2019 г. Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю., Дмитриева Ж.М.

* **Автор для переписки:**

Кириленко Марина Александровна

старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии
ФГБОУ ВО ИВГМА Минздрава России

E-mail: smarina23@mail.ru

аутоштаммов лактобактерий, засеваемых впоследствии и используемое сырье при биотехнологических процессах. Перспективность исследований криозамораживания в этом контексте не вызывает сомнений и требует тщательной экспериментальной проработки.

Цель работы — оценить жизнеспособность аутоштаммов лактобактерий после длительной криоконсервации с учетом масштабирования биотехнологического процесса.

Материалы и методы

В работе был использован комплекс живых аутоштаммов лактобактерий, полученный с использованием оригинальной методики по патенту [5]. Данный комплекс с соблюдением правил асептики помещали в равном объеме (1 мл) и количестве микроорганизмов (не менее 10^7 КОЕ/мл) в стерильные емкости объемом 1 мл и замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для приостановки физиологических процессов без внесения в среду культивирования и криоконсервации дополнительных криопротекторов для улучшения сохранности клеток лактобактерий. Герметично закрытые емкости с аутопробиотическим комплексом (АПК), находящиеся на хранении в морозильной камере, периодически отбирали через 3—6—9—12—24 месяца. После кратковременного оттаивания данных ампул (без окончательного размораживания) содержимое помещали в жидкую питательную среду (MRS), затем инкубировали при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 и 48 часов для оценки жизнеспособности АПК.

Оценку жизнеспособности подтверждали путем сравнения исходного состояния АПК до момента низкотемпературной консервации и сравнения оптической плотности АПК для определенного временного отрезка указанного эксперимента нефелометрическим методом исследования.

В нефелометрических экспериментах использовали калориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2, предназначенный для измерения коэффициентов пропускания и оптической плотности жидкостных растворов. Измерения оптической плотности выросшей культуры клеток лактобактерий на жидкой питательной среде (MRS) выполняли при длине волны 540 нм, объеме кюветы $3,05\text{ см}^3$.

Оптическую плотность определяли по формуле

$$D = -lg \frac{F\lambda}{F_0\lambda},$$

где D — оптическая плотность, $F_0\lambda$ — полный световой поток, $F\lambda$ — световой поток, прошедший через исследуемую среду.

Проверка жизнеспособности лактобактерий из состава АПК в процессе масштабирования была выполнена следующим образом: 1 мл криозамороженного АПК из емкости хранения вносили в 9 мл жидкой питательной среды и культивировали при оптимальных условиях в течение 24 часов. Затем выросшую культуру объемом 10 мл вносили в 90 мл среды и снова инкубировали, далее отбирали 50 мл и вносили в 450 мл среды с последующим термостатированием. Из последней пробы 100 мл культуры переносили в 900 мл среды и вновь ставили на инкубацию. Через 24 часа проводили измерение оптической плотности каждого образца. Достижение примерно совпадающей оптической плотности развития для каждого образца с предыдущими значениями расценивался нами как положительный и рубежный момент в достижении масштабирования биотехнологического процесса.

Для получения готового молочнокислого продукта содержимое одной из ампул без предварительного размораживания помещали в ультрапастеризованное цельное молоко (1 литр) и затем инкубировали при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов для накопления биомассы. Определяли количество лактобактерий путем установления максимального титра разведения исследуемого материала — готового молочнокислого продукта на основе аутопробиотических штаммов лактобактерий.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением программного пакета Statistica 13. Для анализа использовали значение t-критерия Стьюдента. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе выполнения настоящей работы остро встал вопрос о необходимости внесения в состав питательной среды дополнительных протективных веществ, которые позволили бы длительное время сохранить жизнеспособность лактобактерий в составе АПК. В доступной нам литературе мы не обнаружили информации о конструировании питательных сред (их составе), которые позволяли бы длительно сохранять комплекс аутопробиотических штаммов лактобактерий, а также особенности условий для возврата жизнеспособности клеток до уровней предшествующих этапу криозаморозки.

Несомненным фактом является то, что при криозаморозке увеличивается возможность сохранения клеток в неактивном, но жизнеспособном состоянии длительное время. Как известно, в ходе криозаморозки происходит остановка жизнедеятельности — перевод жизнеспособ-

ных клеток в состояние анабиоза. При замораживании живых организмов происходит быстрый переход воды как жидкости в другое агрегатное состояние — лед. При этом процессе происходит извлечение воды из цитоплазмы клеток и уменьшается количество и активность свободной воды в системе «клетка-окружающая среда», которая подвергается криосохранению. Однако процесс замораживания может негативно сказаться на структурных компонентах клеток, что в дальнейшем может привести к их гибели при реверсии клеток к активному росту после криоконсервации. В связи с этим довольно часто прибегают к введению в состав среды для криоконсервации специальных веществ — криопротекторов. Они должны способствовать снижению осмотического давления внутри клеток и тем самым предотвращать разрыв клеточных оболочек при оттаивании и замораживании [1].

За последние десятилетия было создано большое количество методов консервации, однако большинство из них подразумевает использование очень низких температур, для этого требуются современные морозильники или кельвинаторы (обычно до $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$). При хранении бактерий в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) применяют криопротекторы (защитные питательные среды) двух типов. К первому относятся глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО). Ко второму виду криопротекторов относятся такие вещества, как сахароза, лактоза, глюкоза, маннит, сорбит, декстран и др. В то же время считается, что использование жидкого азота для длительного хранения микроорганизмов обходится очень дорого [7]. Использование низкотемпературных холодильников ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) вполне удовлетворяет сохранению различных штаммов микроорганизмов и именно данное оборудование успешно используется для их криозаморозки и длительного хранения. Как известно, именно такая температура (-50 — $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) используется при получении лиофильно высушенных культур на первых этапах их получения [15].

Отмечено, что правильный выбор питательной среды может увеличивать резистентность клеток при лиофилизации. Например, добавка твин-80 и олеиновой кислоты к мясопептонному бульону в процессе культивирования бактерий повышает выживаемость клеток после хранения [17]. В то же время ряд авторов [8] заявляет о выполнении индуцированного аутолиза микроорганизмов именно олеиновой кислотой особенно в случае использования грамотрицательных бактерий и дрожжей, подчеркивая при этом, что процессы разрушения и формирование новых клеточных стенок с включением метаболитов олеиновой кислоты для растущих клеток протекают одновременно [2].

Лиофильные культуры микроорганизмов возможно хранить длительное время, но со временем количество жизнеспособных клеток в данных образцах снижается [17]. Однако нами было установлено, что при восстановлении лиофильно высушенных культур лактобактерий с добавлением в состав питательной среды сока гриба Шититаке (2,5%) возможно получить большие показатели по жизнеспособности клеток [6]. Это свидетельствует о том, что все-таки повреждения клеток в процессе лиофилизации и последующем хранении присутствуют, но репаративные процессы в клетках возможны, что также можно использовать при получении функциональных продуктов питания в ходе масштабирования их производства.

Процессы лиофилизации и криозамораживания отличаются как по количеству этапов выполнения, так и экономическим затратам. Криозамораживание — процесс менее затратный и одностадийный. Криозамораживаемая микробная культура размещается в емкостях, которые затем герметически закрываются и помещаются на хранение (криозамораживание), причем заморозка и хранение в этом случае совмещаются. Обычно в процессе подготовки штаммов микроорганизмов к криозаморозке используют специально подготовленную среду с криоконсервантом. При этом вносимую биомассу микроорганизмов подвергают порой довольно жесткому внешнему механическому воздействию, например, центрифугированию или ультрафильтрации с последующим ресуспендированием клеток в защитной среде, а это, несомненно, снижает их жизнеспособность и усложняет сам процесс подготовки образцов к криоконсервации, поскольку на каждом из этих этапов обязательно нужно соблюдать правила асептики. Таким образом, процесс криозаморозки микробной культуры становится многоступенчатым и трудозатратным, начиная с этапа подготовки питательной среды вплоть до размещения образцов микробных культур на криосохранение.

Таким образом, среда культивирования может оказывать порой определяющее значение для последующего хранения и восстановления жизнеспособности клеток после криозамораживания. Скорее всего, так и не будет создана одна универсальная среда, которая успешно использовалась бы при криозаморозке различных видов микроорганизмов, поскольку условия ее выполнения и последующее восстановление жизнедеятельности отдельных популяций микроорганизмов значительно разнятся.

На наш взгляд, скорее всего — нет необходимости в конструировании специальных сред хранения для криоконсервации клеток микроорганизмов, поскольку, например, в состав среды MRS входят твин-80 и углеводы.

Использование питательной среды для культивирования без ее усложнения и введения специальных компонентов для криоконсервации может быть оптимальным вариантом, чтобы обратить более пристальное внимание именно в этом направлении для длительного сохранения жизнеспособности микроорганизмов.

Так, например, в ходе выполнения наших исследований обнаружено, что жизнеспособность лактобактерий, входящих в состав АПК при замораживании (-20°C) и длительном сохранении, незначительно снижается, судя по значениям оптической плотности через 24 часа

культивирования (табл. 1). Однако при культивировании исследуемого материала (АПК), ранее подвергнутого криоконсервированию через 48 часов, регистрируется существенный рост оптической плотности относительно первого дня культивирования (24 часа) более чем в 4 раза. Криосохранение в течение 3–6 месяцев практически совпадает в оценке жизнеспособности лактобактерий из состава АПК, а в 9 месяцев и далее наблюдается снижение жизнеспособности лактобактерий относительно начальных цифр для оценки состояния популяции через 48 часов.

Таблица 1

Влияние времени криоконсервирования на развитие АПК нефелометрическим методом

Время криоконсервации	Оптическая плотность $[D = -\lg(F\lambda/F_0\lambda)]$ (n=10)				
	0 мес. (контроль) $0,29\pm 0,02$				
	Время культивирования				
	24 часа	48 часов	Кратность изменения D		
			0/24 часов	0/48 часов	24/48 часов
3 мес.	$0,30\pm 0,01$	$1,36\pm 0,02$	1,04	4,69	4,50
6 мес.	$0,29\pm 0,01$	$1,39\pm 0,02$	0,99	4,48	4,83
9 мес.	$0,28\pm 0,01$	$1,30\pm 0,01$	0,96	4,51	4,68
12 мес.	$0,28\pm 0,01$	$1,23\pm 0,01$	0,95	4,24	4,44
24 мес.	$0,26\pm 0,03$	$1,11\pm 0,01$	0,88	3,85	4,36
Значение t-критерия Стьюдента			45	20,40	0,7
Достоверность (ρ)			<0,05	<0,05	>0,05
Различия статистически:			значимы	значимы	не значимы

Нефелометрический метод исследования развивающейся микробной культуры, несмотря на не совпадающие порой данные между численностью клеток популяции и их физиологическим состоянием, вместе с тем может дать информацию о направленности адаптивного процесса и может быть использован даже при оценке количества жизнеспособных клеток в популяции [4]. Следует особо отметить, что данный метод не обладает большой инерционностью и вполне пригоден для получения информации о развивающейся микробной популяции в режиме online, а также позволяет говорить о направленности адаптивного процесса в целом. Нефелометрический метод оценки состояния бактериальной культуры является косвенным методом, способным охарактеризовать в целом реакцию популяции на действующий фактор криозамораживания и сохранения жизнеспособности микроорганизмов при последующем возврате к активному росту.

Процесс замораживания АПК осуществляется в одинаковом небольшом объеме и протекает в этой связи достаточно быстро и что немаловажно — в одну стадию,

где емкости для заморозки (пробирки) становятся впоследствии емкостями хранения, что снижает риск возможной контаминации посторонними микроорганизмами. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Оптическая плотность криоконсервированного АПК при его масштабировании

Объем порционного АПК (мл)	Оптическая плотность (D)	Достоверность (ρ)
10	$0,29\pm 0,02$	—
100	$0,28\pm 0,01$	>0,05 (данные не значимы)
500	$0,29\pm 0,01$	>0,05 (данные не значимы)
1000	$0,27\pm 0,01$	>0,05 (данные не значимы)

Согласно полученным данным, оптическая плотность в конечных точках процесса масштабирования (см. табл. 2) практически совпадает (отличия t-критерия Стьюдента не достоверны). Это свидетельствует о достаточном накоплении биомассы лактобактерий из состава

АПК и их высокой физиологической активности после процесса криоконсервации во всех этапах масштабирования. В связи с полученными нами данными можно констатировать тот факт, что однозначно существует возможность получения криоконсервированной формы препарата в виде замороженного бактериального препарата АПК, содержащего живые лактобактерии, без потери их жизнеспособности и активности при длительном хранении (не менее 2 лет).

Интересным представляется факт по оценке численности лактобактерий после восстановления криоконсервированного и длительно хранящегося АПК в молоке, то есть в готовом продукте. Последнее обстоятельство важно с точки зрения возможного масштабирования процесса в ходе получения достаточного объема АПК для последующего использования как продукта функционального питания при коррекции и поддержании постоянства молочнокислой микрофлоры кишечника.

При использовании криоконсервированного инокулята АПК получали готовый молочнокислый продукт (1 л) и определяли в нем количество лактобактерий (титр). В независимой Испытательной микробиологической лаборатории Росстандарта (г. Иваново) был проведен эксперимент по установлению титра лактобактерий в готовом молочнокислом продукте. При масштабировании роста лактобактерий из состава АПК титр достигал количества 107–108 кл/мл (протокол исследований № 6/н от 22 июня 2018 г.), что соответствует техническому регламенту таможенного контроля «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013). Кроме того, установлено, что практически не наблюдалось изменений по количеству лактобактерий в готовых продуктах различных серий при использовании одного и того же инокулята: соответственно титр составил 107 (протокол исследований № 6/н от 31 августа 2018 г.). Выполнение такого рода эксперимента послужило значимым подтверждением жизнеспособности и активности, а также микробиологической чистоты получаемого молочнокислого продукта, который может быть применен по назначению.

Длительность хранения лактобактерий без потери их жизнеспособности и активности представляет собой довольно важную проблему и в дальнейшем может представлять значительный научный интерес с точки зрения перспектив создания банка АПК лактобактерий, с возможностью быстрого получения необходимого количества продуктов функционального питания для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ у конкретных индивидуумов.

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Установлена возможность длительного сохранения и последующего использования предварительно криоконсервированного аутопробиотического комплекса штаммов живых лактобактерий в условиях низкотемпературного воздействия (при -20°C в течение 24 месяцев).

2. Способ получения готового молочнокислого продукта на основе индивидуального комплекса лактобактерий (АПК) обладает несомненной привлекательностью в плане использования существенно более высокой, в сравнении с жидким азотом температуры.

3. Криоконсервирование АПК лактобактерий позволяет создавать банк длительно хранящихся микроорганизмов без существенной потери их биологической активности.

4. При использовании криоконсервированного АПК возможно выполнить быстрое масштабирование объемов необходимого индивидуального молочнокислого продукта, что имеет существенное значение для лечения и профилактики дисбактериоза кишечника.

Литература

1. Бояринева И.В., Хамагаева И.С., Столярова А.С., Калужских Ю.Г. Криоконсервирование бактериального концентрата симбиотической закваски для хлебопекарного производства // Ползуновский вестник. — 2016. — № 3. — С. 13–17.
2. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Бабусенко Е.С., Козлова А.Н., Дужа М.В., Митюшина Л.А., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм в автолизирующихся суспензиях микроорганизмов // Микробиология. — 1997. — Т. 66. — № 1. — С. 42–49.
3. Новик Г.И., Сидоренко В. Криоконсервация пробиотических микроорганизмов // Проблемы криобиологии. — 2008. — Т. 18. — № 2. — С. 215.
4. Патент 2037805 РФ. G01N 15/06, C12Q 1/06. Способ определения содержания живых микробов в биопрепарате / Швецов С.А.; патентообладатель Научно-исследовательский институт микробиологии Министерства обороны РФ; заявл. 28.08.1992; опубл. 19.06.1995. Бюл. № 16. — 18 с.
5. Патент 2505304 РФ. МПК51 А61К 35/74, А23С 9/127. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые лактобактерии и бифидобактерии / Кузнецов О.Ю., Кузнецова Л.А., Кузнецов А.О., Борисова Е.М.,

- Сафонова М.А.; патентообладатель Кузнецов Олег Ювельевич; заявл. 22.06.2010; опубл. 27.01.2014. Бюл. № 3. — 7 с.
6. Патент 2661737 РФ. МПК51 А61К 35/74. Способ получения препарата эубиотика Лактобактерин / Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Ивановская государственная академия» Минздрава России; заявл. 17.07.2017; опубл. 19.07.2018. Бюл. № 20. — 4 с.
 7. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Дедушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. — 2009. — № 4(12). — С. 99–121.
 8. Рыбин В.Г., Блинов Ю.Г. Антимикробные свойства липидов // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра. — 2001. — Т. 129. — С. 179–196.
 9. Савкина О.А., Терновской Г.В., Локачук М.Н. Кримоконсервация — перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий для хлебных заквасок / Сб. материалов II Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт табака, махорки и табачных изделий РАСХН. — М., 2014. — С. 106–110.
 10. Сафонова М.А., Кузнецов О.Ю. Пробиотические препараты для коррекции микробиологических нарушений кишечника // Вестник Ивановской медицинской академии. — 2012. — Т. 17. — № 1. — С. 49–54.
 11. Сафронова В.И., Оследкин Ю.С., Свиридова О.В., Воробьев Н.И. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов: методические рекомендации. — СПб.: ГНУ ВНИИСХМ, 2007. — 32 с.
 12. Birger M.O. Handbook on microbiological and viral research methods. — Moscow: Meditsina, 1992. — 464 p.
 13. Hacker J. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution // Molecular Microbiology. — 1997. — Vol. 23(6). — P. 1089–1097.
 14. Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eschina A.S. Particular medical microbiology with techniques of microbiological studies: Manual. — Moscow; Meditsina, 2005. — 598 p.
 15. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying: A review // Journal of Microbiological Methods. — 2006. — Vol. 66(2). — P. 183–193.
 16. Pozdeyev O.K. Medical microbiology. — Moscow, 2001. — 768 p.
 17. Uzunova-Doneva T., Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms // Journal of Culture Collections. — 2005. — Vol. 4. — P. 17–28.

THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON THE SURVIVAL OF A COMPLEX OF LACTIC ACID BACTERIAL AUTOSTRAINS DURING STORAGE AND BIOTECHNOLOGICAL SCALING PROCESSES

M.A. KIRILENKO, O.Yu. KUZNETSOV, J.M. DMITRIEVA

Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of Russian Federation, Ivanovo

During the production of lactic acid products, starter cultures recovered from lyophilized strains of microorganisms are used. Often in this production using different types of lactobacilli. One of the most affordable methods of preserving the necessary strains of bacteria, except for lyophilization, is freezing (cryoconservation) at certain temperatures. Therefore, the question arises of long-term preservation of the quality and quantity of viable lactobacillus cells seeded in the raw materials used in biotechnological processes. In this work, a complex of living lactobacillus autostrains obtained from a specific individual was used. This complex was placed in an equal volume and quantity of microorganisms in sealed sterile containers in a volume of 1 ml and frozen at -20°C . Containers with lactobacilli stored were periodically taken out, the contents were placed in a sterile nutrient medium, and then incubated under optimal conditions to assess viability. During the cultivation of the studied material, previously subjected to cryopreservation after 48 hours, a significant increase in optical density relative to the first day of cultivation (24 hours) is registered more than 4 times. After receiving the finished lactic acid product using cryogenic storage of the complex of lactobacillus autostrains, its viability was confirmed under the conditions of low-temperature exposure for 24 months.

Keywords: lactobacilli, cryopreservation, scaling, autoprobiotic complex, lactic acid products.

ЛИТИЧЕСКИЕ И СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СМЕСИ БАКТЕРИОФАГ-ХИТОЗАН

М.В. ОВЧИННИКОВА*, Г.И. КОРОВКИНА, О.С. ЗИНИНА, В.В. РОГОЖИН,
Т.Ю. КИРИЛЛОВА, А.К. НИКИФОРОВ, А.К. АДАМОВ

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,
Саратов*

В работе представлены результаты исследований влияния природного полисахарида хитозана на холерный бактериофаг в экспериментальной системе. Полученные данные свидетельствуют, что кислоторастворимый хитозан агглютинирует культуру индикаторного штамма холерного вибриона и в определенных концентрациях подавляет развитие фаговой инфекции путем инактивации фаговых частиц и ингибирования репродукции бактериофагов на внутриклеточном уровне. Обнаружено, что экспериментальные смеси, отличающиеся по процентному содержанию хитозана и его фракционному составу и содержащие холерный бактериофаг, проявляют относительный бактериостатический эффект в отношении холерного вибриона O1 серогруппы, который становится более выраженным при предварительной инокуляции холерного вибриона в опытной смеси. Установлен концентрационный оптимум хитозана для реализации литических свойств бактериального вируса, что представляет собой неотъемлемую часть экспериментальной системы против холеры.

Ключевые слова: бактериофаг, холерный вибрион, хитозан, концентрация, лизис.

Введение

Известно, что главным фактором, который определяет патогенез холеры, является экзотоксин. Для нейтрализации действия холерного экзотоксина, обуславливающего развитие ярко выраженной секреторной диареи, приводящей к резкому обезвоживанию организма и значительным нарушениям электролитного баланса, целесообразным и эффективным может оказаться применение энтеросорбентов, которые сегодня успешно используются в комплексной терапии различных заболеваний [9, 12]. Эффект энтеросорбции при холере можно существенно усилить за счет использования комплексных препаратов, в которых сорбент выполняет не только свои «очищающие» функции, но и служит носителем токсиннейтрализующих антител или антибактериального компонента.

В настоящее время в медицинской биотехнологии для создания современных лекарственных форм широко используются природные полимерные материалы, сочетающие в себе высокую технологичность производства

с безвредностью, а зачастую и лечебное действие [6, 7, 13]. В связи с этим при разработке новых материалов для медицинского применения особо отмечают природный полисахарид хитозан, что обусловлено его низкой токсичностью, биосовместимостью и биоразрушаемостью [14, 15]. В некоторых работах продемонстрирована перспектива использования в качестве исходного материала хитозана для микрокапсулирования альфа-интерферона, витаминов и других биологически активных молекул [3, 4]. Показана принципиальная возможность конструирования специфического энтеросорбционного препарата на основе кислоторастворимого хитозана и антитоксического иммуноглобулина, направленного действующего на нейтрализацию холерного токсина [11].

Особый интерес в качестве иммобилизованного агента представляют бактериофаги, которые также могут использоваться для конструирования специфических энтеросорбционных препаратов. Отсутствие противопоказаний и осложнений при применении терапевтических препаратов «естественных пожирателей бактерий», возможность их применения в сочетании с другими лекарственными средствами, активность в отношении антибиотикорезистентных штаммов и их адаптация к возбудителям позволяют рассматривать препараты бактериофагов как высокоэффективное и перспективное средство терапии экстренных гнойно-септических и энтеральных инфекций [1, 2, 5].

© 2019 г. Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Рогожин В.В., Кириллова Т.Ю., Никифоров А.К., Адамов А.К.

* **Автор для переписки:**

Овчинникова Мария Владимировна

канд. биол. наук, заведующий лабораторией диагностических препаратов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора»

E-mail: begemot2006@list.ru

При конструировании комбинированных специфических препаратов большое внимание уделяется вопросам изучения эффектов взаимного влияния компонентов сложной системы биологически активных веществ.

Известно, что одной из уникальных биологических активностей хитозана является его способность индуцировать устойчивость к вирусным заболеваниям у растений, ингибировать вирусные инфекции у животных и предотвращать развитие фаговых инфекций в зараженной культуре микроорганизмов [13]. Было показано [8, 16], что хитозан, добавленный в питательную среду, препятствует размножению вирулентных бактериофагов в зараженной культуре как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Вследствие этого выход инфекционных ДНК-содержащих фагов в присутствии хитозана может снижаться на несколько порядков. Вклад каждого из этих элементов зависит от структуры молекулы хитозана, его концентрации и физико-химических свойств, вида бактериофага и состава питательной среды [8]. В то же время не исключена возможность успешного конструирования сложных биологических систем на основе бактериофагов и хитозана [10], в которых каждый из активных компонентов не только выполняет свои необходимые функции, но при этом и констатируется эффект потенцирования.

В этой связи, учитывая возможность терапевтического использования бактериофагов, их лизирующие свойства и высокую специфичность, а также сорбционную способность хитозана, целью настоящего исследования явилось изучение взаимодействия кислоторастворимого хитозана и холерного бактериофага, с перспективой применения и хитозана и бактериофага в составе комплексного препарата против холеры и других кишечных инфекций.

Материалы и методы

В опытах использовали кислоторастворимый хитозан производства ЗАО «Биопрогресс», Россия. Мол.м. хитозана составляла 200 кДа, степень деацетилирования 85%. Концентрация рабочих растворов — 2, 5, 10, 15, 20 и 25%; диагностический холерный бактериофаг производства ФКУЗ РосНИПИ «Микроб», применяемый для диагностики классического биовара холерных вибрионов, и индикаторный штамм *V. cholerae* O1 классического биовара.

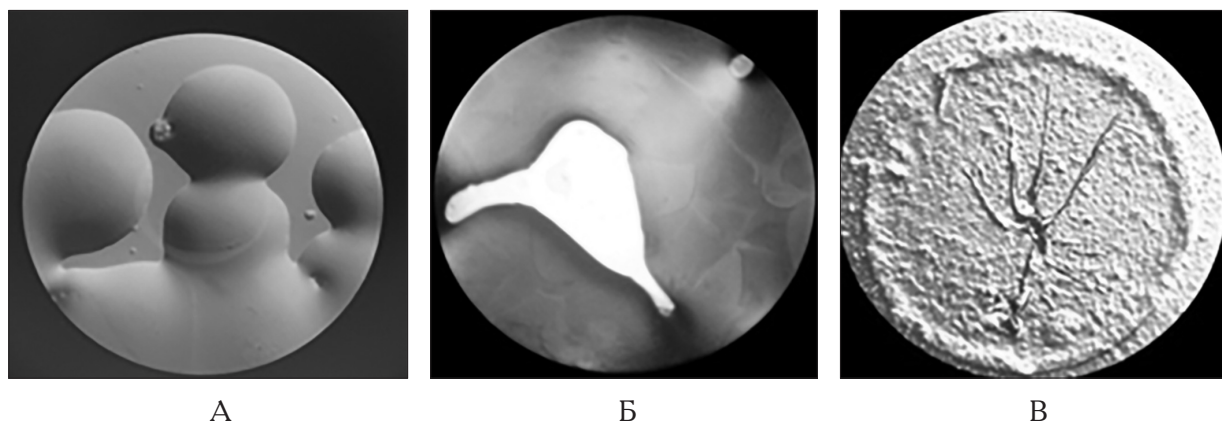
Исследования реализации функций экспериментальной смеси проводили в реакции Апшельмана и двух-

слойным методом Грациа. Визуально оценивали степень лизиса и наличие осадка в пробирках, констатировали наличие или отсутствие негативных колоний фага на чашках Петри с питательным агаром. Работу проводили в несколько этапов.

Первый этап эксперимента был направлен на изучение совместного взаимодействия фага и хитозана с клетками холерного вибриона классического биовара. В рабочие растворы хитозана одновременно добавляли определенное количество бактериофага и индикаторный штамм, смеси инкубировали 18–20 ч при температуре 37 °С. После инкубации визуально оценивали степень лизиса и наличие осадка в пробирках. Было определено, что, начиная с 2 до 10% концентрации полисахарида, в опытных образцах наблюдался лизис на 4⁺ и небольшой осадок на дне. С увеличением процентного содержания хитозана отмечалось снижение степени лизиса на 3⁺ — 2⁺ и увеличение осадка. При последующем высеве 0,1 мл надосадочной жидкости из всех проб на чашки Петри с газонем индикаторного штамма литических пятен фага обнаружено не было.

Учитывая, что репликация фаговой ДНК и генез фаговых частиц тесно связаны с мембранами [16] и предположительно ингибирование репродукции бактериофагов опосредовано негативным влиянием хитозана на клеточные мембраны микроорганизмов, дальнейший этап работы был связан с определением наличия жизнеспособных клеток *V. cholerae* O1 после взаимодействия с экспериментальной смесью. Для этой цели из опытных образцов с концентрацией хитозана 2 и 10% делали разведения с последующим высевом из каждого по 0,1 мл на поверхности питательного агара. После инкубации 18–22 ч подсчитывали количество выросших колоний, оценивали их морфологию и поверхностную структуру под увеличением 4×/0,10 (рис. 1). Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Далее изучали динамику развития бактериостатического эффекта экспериментальной смеси в отношении холерного вибриона: в рабочие растворы хитозана и бактериофага добавляли индикаторный штамм, смеси инкубировали 5 и 22 ч при температуре 37 °С. Как и в предыдущем эксперименте делали ряд разведений с последующим высевом из каждого по 0,1 мл на поверхности питательного агара. После инкубации 18–22 ч подсчитывали количество выросших колоний, оценивали их морфологию и поверхностную структуру при увеличении 4×/0,10 (рис. 2). Результаты эксперимента представлены в таблице 2.



А

Б

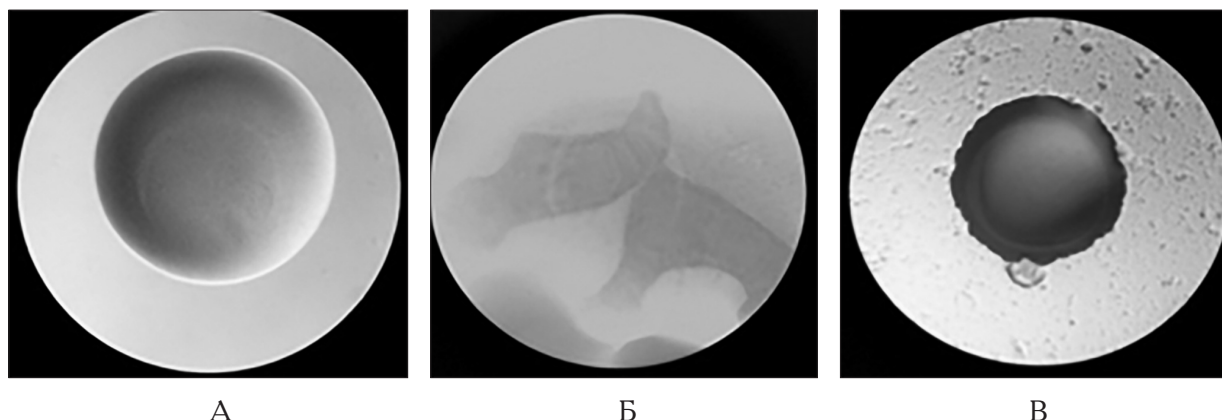
В

Рис. 1. Морфология и поверхностная структура *V. cholerae* O1 при увеличении 4×/0,10 (микроскоп «MICROS MC20»). А: контроль культуры — типичная S-форма холерного вибриона; Б: осколочный газон полимера; В: погибшая колония *V. cholerae* O1 под слоем хитозана

Таблица 1

Количество микробных клеток при высеве 0,1 мл исследуемых растворов

Характер роста <i>V. cholerae</i> O1 на плотной питательной среде, количество колоний					
Разведение рабочих растворов	ц	1:10	1:100	1:10000	1:1000000
Образец					
Хитозан 10% + б/фаг + <i>V. cholerae</i> O1	Разреженная осколочная структура полимера в виде сплошного газона. Колонии <i>V. cholerae</i> отсутствуют	Сильно разреженный осколочный газон полимера. Колонии <i>V. cholerae</i> отсутствуют	Мелкие колонии <i>V. cholerae</i> в R-форме ≈400	≈200 колоний <i>V. cholerae</i> в R-форме	≈10–20 колоний <i>V. cholerae</i> в R-форме
Хитозан 2% + б/фаг + <i>V. cholerae</i> O1	Разреженная осколочная структура полимера в виде сплошного газона. Просматриваются светлые мелкие колонии <i>V. cholerae</i> в R-форме	Сильно разреженный осколочный газон полимера. Колонии <i>V. cholerae</i> отсутствуют	Многочисленные мелкие колонии <i>V. cholerae</i> в R-форме	≈150 колоний <i>V. cholerae</i> в R-форме	0
Контроль культуры	Сплошной газон <i>V. cholerae</i>	Сплошной газон <i>V. cholerae</i>	Сплошной газон <i>V. cholerae</i>	Типичные изолированные колонии <i>V. cholerae</i> ≈1500	Типичные изолированные колонии <i>V. cholerae</i> ≈600
Контроль фага	0				



А

Б

В

Рис. 2. Морфология и поверхностная структура *V. cholerae* O1 при увеличении 4×/0,10 (микроскоп «MICROS MC20»). А: контроль культуры — типичная S-форма холерного вибриона; Б: осколочный газон полимера; В: культура *V. cholerae* O1 после взаимодействия с экспериментальными смесями, R-форма

Таблица 2

**Количество микробных клеток при высеве 0,1 мл исследуемых растворов
в зависимости от времени взаимодействия**

Характер роста <i>V. cholerae</i> на плотной питательной среде, количество выросших колоний											
Образец	Разведение рабочих растворов	5 ч					22 ч				
		ц	1:10	1:100	1:10000	1:1000000	ц	1:10	1:100	1:10000	1:1000000
хитозан 10% + фаг	Следы газона полимера	0	0	0	0	0	Осколочный газон полимера	Следы осколочного газона полимера	≈3500–4000 колоний <i>V. cholerae</i>	≈180 колоний	20 колоний <i>V. cholerae</i>
хитозан 2% + фаг	Следы газона полимера	4 колонии	0	0	0	0	Осколочный газон полимера 4–5 мелких колоний <i>V. cholerae</i>	Следы осколочного газона полимера	Многочисленные изолированные колонии <i>V. cholerae</i>	≈140 колоний	10 колоний <i>V. cholerae</i>
Контроль культуры	Сплошной рост <i>V. cholerae</i>	Сплошной рост <i>V. cholerae</i>	Сплошной рост <i>V. cholerae</i>	Многочисленные изолированные колонии <i>V. cholerae</i>	≈4000 колоний	Сплошной рост <i>V. cholerae</i>	Сплошной рост <i>V. cholerae</i>	Сплошной рост <i>V. cholerae</i>	Многочисленные изолированные колонии культуры, ≈1000 кол	≈4600 колоний <i>V. cholerae</i>	

В целях определения концентрационного оптимума хитозана для реализации литических свойств бактериофага в следующий этап эксперимента брали растворы полимера, отличающиеся и по фракционному составу, и по процентному содержанию.

Смеси хитозана с размерами частиц 1,0 до 5,0 мкм и от 0,1 до 0,8 мкм в концентрациях 0,5%, 1%

и бактериофага с титром 3×10^8 фаговых частиц в 1 мл предварительно инкубировали 30 мин в условиях термостата (37 °C), затем добавляли индикаторный штамм *V. cholerae* O1 классического биовара и инкубировали 18 ч при температуре 37 °C.

Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3

Реализация литических свойств бактериофага в смеси с хитозаном

% содержание хитозана	Вариант посева экспериментальных смесей на чашки с питательным агаром	
	Без культуры индикаторного штамма	С газоном индикаторного штамма на поверхности агара
Центрифугат		
5	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в R-форме	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в R-форме
2	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в R-форме	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в R-форме
1	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> частично в S-R-форме	Единичные негативные колонии фага на фоне сплошного роста <i>V. cholerae</i> в R-форме
0,5	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> частично в S-R-форме	Многочисленные негативные колонии фага
Супернатант		
5	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в R-форме	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в S-R-форме, 3 негативные колонии фага
2	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в S-R-форме	Многочисленные негативные колонии фага
1	Сплошной рост <i>V. cholerae</i> в S-R-форме	Многочисленные негативные колонии фага
0,5	Полусливной лизис	Полусливной лизис

Результаты и обсуждение

Полученные данные первого этапа эксперимента дали возможность предположить, что хитозан во всех взятых концентрациях (2, 5, 10, 15, 20 и 25%) агглютинирует культуру и, возможно, подавляет развитие фаговой инфекции путем инактивации фаговых частиц и ингибирования репродукции бактериофагов на внутриклеточном уровне.

Далее было установлено, что экспериментальные смеси, содержащие 2 и 10% хитозана (мол. м. 200 кДа, степень деацетилирования 85) и холерный бактериофаг, проявляют относительный бактериостатический эффект в отношении холерного вибриона O1 серогруппы, который становится более выраженным при предварительной инокуляции взвеси холерного вибриона в течение 5 часов. С понижением концентрации полисахарида антимикробная активность снижается, однако сохраняются неблагоприятные условия для роста и размножения холерного вибриона, что выражается как в частичной гибели колоний, так и появлении нетипичных колоний *V. cholerae* O1 в R-форме. Фаг обнаружить в такой культуре не представлялось возможным.

Ряд экспериментов с растворами, отличающимися не только по процентному содержанию хитозана, но и по фракционному составу показал, что все взятые в эксперимент концентрации хитозана повреждают поверхностные структуры бактериальной клетки — констатировали сплошной рост *V. cholerae* O1 в R-форме. Снижение концентрации хитозана до 1% в растворе центрифугата и до 5% в растворе супернатанта с частицами от 1,0 до 5,0 мкм и 0,1 до 0,3 мкм, соответственно, способствовало проявлению фаговой инфекции: на газоне индикаторного штамма отмечали единичные негативные фаговые колонии. Однако только раствор супернатанта в 0,5% концентрации манифестировал полусливной лизис индикаторной культуры, свидетельствующий об отсутствии повреждающего действия хитозана на бактериальные клетки и достаточном нахождении фага в смеси с полисахаридом.

Заключение

Таким образом, в ходе работы было установлено, что 0,5% концентрация полимера хитозана с размером частиц от 0,1 до 0,3 мкм в опытных образцах позволяет проявлять литические свойства фага. Обозначенный концентрационный оптимум для хитозана является основой для серии дальнейших экспериментов по определению

сорбционной активности и токсиннейтрализующей способности комплексов бактериофагов и полимера, в целях конструирования нового препарата для лечения и профилактики острых кишечных инфекций, в том числе холеры.

Литература

1. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. — М.: Научный мир, 2012. — 640 с.
2. Бехтерева М.К., Иванова В.В. Место бактериофагов в терапии инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта // *Consilium medicum*. — 2014. — № 2. — С. 24–29.
3. Губайдуллина А.А. Получение модифицированных форм интерферона, обладающих пролонгированным действием: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Уфа, 2010. — 22 с.
4. Зубарева А.А. Разработка систем доставки активных веществ на основе наночастиц хитозана и его производных: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2013. — 24 с.
5. Зуева Л.П., Асланов Б.И., Долгий А.А., Гончаров А.Е., Архангельский А.И. Бактериофаги — факторы эволюции госпитальных штаммов и средства борьбы с инфекциями // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. — 2012. — № 1. — С. 9–13.
6. Ильина А.В., Куликов С.Н., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Варламов В.П. Получение и исследование моносахаридных производных низкомолекулярного хитозана // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2008. — Т. 44. — № 5. — С. 606–614.
7. Коненков В.И., Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Бурмистров В.А. Селективные наносорбенты для медицины / Сб. трудов научно-практической конференции с международным участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины». Ч. 2. — Новосибирск, 2007. — С. 88–94.
8. Кочкина Э.М., Поспешны Г., Чирков С.Н. Ингибирование хитозаном продуктивной инфекции бактериофагов Т-серии в культуре *Escherichia coli* II // *Микробиология*. — 1995. — Т. 64. — № 2. — С. 211–215.
9. Палий И.Г., Резниченко И.Г. Современный взгляд на проблему энтеросорбции: выбор оптимального препарата // *Препарати і технології*. — 2008. — № 6(52). — С. 46–49.
10. Патент № 2156133 РФ, МКИ А61К 35/74. Гелевая лекарственная форма медицинского иммунобиологического препарата с бактериофагами. Чубатова С.А., Жиленков Е.Л., Панюшин С.К., Попова В.М., Тульский В.С., Мантиков Абдул Вагаб Багаудинович, Кузнецова Г.В.
11. Патент № 2611356 РФ, МПК А61К 31/722, А61К 39/40, А61Р 39/00. Энтеросорбент для направленной сорбции холерного экзотоксина, лекарственная форма энтеросорбента для направленной сорбции холерного

- экзотоксина. Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н., Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Кутырев В.В.
12. Учайкин В.Ф., Новокионов А.А., Соколова Н.В. Энтеросорбция — эффективный метод этиопатогенетической терапии острых кишечных инфекций // Дет. инфекции. — 2005. — № 3. — С. 39–43.
13. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. — М.: Наука, 2002. — 368 с.
14. Хотимченко М.Ю. Сорбционные свойства и фармакологическая активность некрахмальных полисахаридов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Владивосток, 2011. — 47 с.
15. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В. Применение энтеросорбентов в медицине // Тихоокеанский мед. журнал. — 1999. — № 2. — С. 84–89.
16. Sudarshan N.R., Hoover D.G., Knorr D. Antibacterial action of chitosan // Food Biotechnol. — 1992. — Vol. 6. — No. 3. — P. 257–272.

LYTIC AND SORPTION PROPERTIES OF THE EXPERIMENTAL MIXTURE OF BACTERIOPHAGE-CHITOSAN

M.V. OVCHINNIKOVA, G.I. KOROVKINA, O.S. ZININA, V.V. ROGOZHIN,
T.Yu. KIRILLOVA, A.K. NIKIFOROV, A.K. ADAMOV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor, Saratov

The paper presents the results of studies of the effect of the natural chitosan polysaccharide on cholera bacteriophage in the experimental system. The data obtained indicate that acid-soluble chitosan agglutinates the culture of the indicator strain of *Vibrio cholerae* and at certain concentrations inhibits the development of phage infection by inactivating phage particles and inhibiting the reproduction of bacteriophages at the intracellular level. It was found that experimental mixtures, differing in the percentage of chitosan and its fractional composition and containing a cholera bacteriophage, exhibit a relative bacteriostatic effect with respect to the *Vibrio cholerae* O1 of the serogroup, which becomes more pronounced upon preliminary inoculation of *Vibrio cholerae* in the experimental mixture. The concentration optimum of chitosan has been established for the realization of the lytic properties of the bacterial virus, which is an integral part of the experimental system against cholera.

Keywords: bacteriophage, *Vibrio cholerae*, chitosan, concentration, lysis.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МЕТАБОЛИТА *TRICHODERMA ASPERELLUM* F-1087 НА РАКОВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА

Л.М. ТИМЕРБУЛАТОВА^{2*}, РИН.С. МУХАММАДИЕВ¹, РИШ.С. МУХАММАДИЕВ¹,
В.В. БИРЮЛЯ¹, А.А. НАБАТОВ³, Т.В. БАГАЕВА²

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,

² ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

³ Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Казань

Рак молочной железы в структуре заболеваемости и смертности женского населения остается ведущей онкопатологией как в России, так и в мире. Поэтому остро стоит проблема поиска новых методов терапии лекарственными препаратами против данного заболевания. В настоящей работе нами выделены вторичные пептидные метаболиты, продуцируемые штаммом *Trichoderma asperellum* F-1087, и изучена их цитотоксическая активность на клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7 и на клетках фибробластов кожи человека — HSF. Показано более выраженное действие против быстро пролиферирующих MCF-7 клеток ($IC_{50}=0,6\pm 0,04$ мг/мл) по сравнению с HSF ($IC_{50}=0,9\pm 0,04$ мг/мл). Таким образом, у выделенного пептидного метаболита обнаружен терапевтический потенциал против быстро пролиферирующих раковых клеток.

Ключевые слова: вторичные метаболиты, *Trichoderma asperellum*, MCF-7, HSF.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным онкологическим заболеванием среди женщин. Заболеваемость раком молочной железы в развивающихся странах возрастает в связи с ростом продолжительности жизни, более поздней рождаемостью детей и ухудшением экологии. РМЖ во всем мире лидирует среди онкологической патологии, уступая по распространенности раку легких. В России заболеваемость РМЖ среди всех онкологических заболеваний у женщин в возрасте от 40 до 78 лет увеличилась с 2008 по 2018 гг. с 42 до 48% [1, 4]. При этом классическая химиотерапия РМЖ чрезвычайно токсична для человека, а современные подходы лечения моноклональными антителами дороги; поэтому вопрос о поиске новых подходов к лечению остается открытым.

Trichoderma — это род плесневых грибов, широко распространенных в самых разных климатических зонах

и заселяющих разнообразные места обитания. Грибы рода *Trichoderma* являются хорошими производителями вторичных метаболитов, в том числе пептидных, которые обладают высокой цитотоксичностью [5–8, 10]. Нами были выделены и охарактеризованы пептидные вторичные метаболиты *Trichoderma asperellum* F-1087. Вторичные метаболиты также могут проявлять цитотоксическую активность, разрушая цитоплазматическую мембрану путем образования пор [3, 12].

В настоящем исследовании мы изучали цитотоксическую активность вторичных метаболитов *Trichoderma asperellum* F-1087 на клеточных линиях рака молочной железы человека и фибробластов кожи человека. Полученные нами данные показывают выраженное цитотоксическое действие вторичных метаболитов *T. asperellum* F-1087 на быстро пролиферирующие клетки.

Материалы и методы

Объектом исследования был штамм плесневого гриба *Trichoderma asperellum* F-1087. Пептидные вторичные метаболиты из гриба выделялись как нами было описано ранее [12]. Культуру гриба выращивали на твердой питательной среде Чапека, культивирование осуществляли в темноте 14 сут при 28 °С [2]. Мицелий с частью твердой среды помещали в жидкую питатель-

© 2019 г. Тимербулатова Л.М., Мухаммадиев Рин.С., Мухаммадиев Риш.С., Бирюля В.В., Набатов А.А., Багаева Т.В.

* Автор для переписки:

Тимербулатова Лейсан Маратовна

аспирант, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань

E-mail: public.mail@kpfu.ru

ную среду Чапека и культивировали в течение 14 сут на подвесной качалке «Helicon» (Германия) со скоростью вращения платформы 80 об./мин при 28 °С. По окончании культивирования культуральную жидкость (КЖ) *T. asperellum* F-1087 отделяли фильтрованием через слой марлевой ткани и центрифугировали при 48300 g в течение 15 мин. К супернатанту очищенной КЖ приливали этилацетат («Химмед», Россия) в соотношении 1:1, перемешивали и инкубировали в течение 24 ч при 4 °С. Верхнюю (этилацетатная) фазу (ЭАФ) упаривали до 100 мл на роторном вакуумном испарителе («Heidolph», Германия). Для качественного определения пептидной природы вторичных метаболитов проводили биуретовую реакцию, для количественного — проводили измерение концентрации белка на Nanodrop 2000 (США).

Линии клеток фибробластов кожи (HSF) и клеток линии рака молочной железы человека (MCF-7) были предоставлены из коллекции культур клеток Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (При-волжского) федерального университета и Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии. Изучение цитотоксической активности вторичных метаболитов определяли по выживаемости культур клеток общепринятым методом МТТ-теста [9, 11]. Клеточные линии HSF и MCF-7 культивировали в среде DMEM («Gibco», США), содержащей 10% FBS, 0,5% пенициллина-стрептомицина, 0,5% 200 мМ L-глутамина в инкубаторе MCO-19AIC (Сапуо, Япония) при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 95% влажности. Перед началом экспериментов оценивали жизнеспособность клеток, которая составила не менее 95%. Клетки высевали в 96-луночные планшеты 0,5×10⁴/мл (количество считали камерой Горяева) и культивировали в инкубаторе в тех же условиях в течение 24 часов.

Культуральную жидкость 14-го дня роста (C=1,137 мг/мл) и этилацетатную фракцию (ЭАФ) (C=11,109

мг/мл) гриба вносили в лунки планшета с HSF и MCF-7 клетками (полученную смесь выдерживали при температуре 37 °С и 5% CO₂ в течение 72 часов). После этого к клеткам вносили 4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ-реагент, 0,5 мг/мл), растворенный в фосфатном солевом буфере (150 мМ NaCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, pH 7,4), и проводили инкубацию смеси в течение 3 часов. После аспирирования красителя добавляли диметилсульфоксид (ДМСО), выдерживали в течение 10 минут и проводили измерение оптической плотности на микропланшетном ридере TECAN Infinite M200 Pro, при длине волны 555 нм (референтная длина — 750 нм). Цитотоксическую активность КЖ и ЭАФ на клетки в условиях *in vitro* выражали через значения параметров IC₅₀ (наименьшая концентрация токсина, способная к 50% ингибированию роста клеток изучаемой культуры). В качестве контроля использовались клетки, инкубированные без добавления КЖ и ЭАФ.

Морфологические изменения в клетках MCF-7 и HSF были исследованы с использованием микроскопа «Nikon Eclipse TS 100» (Япония) и программы Score Photo 3.0. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2013 (p≤0,05). Значения IC₅₀ оценивали на основе дозозависимых кривых с использованием программы Origin™.

Результаты и обсуждение

Исследования цитотоксической активности метаболитов проводились с КЖ и ЭАФ *T. asperellum* F-1087 методом МТТ-теста [9, 11]. Результаты теста показали гибель клеток как MCF-7, так и HSF, но в различной степени (рис. 1, 2). Сводные данные по гибели клеточных линий и IC₅₀ указаны в таблице 1.

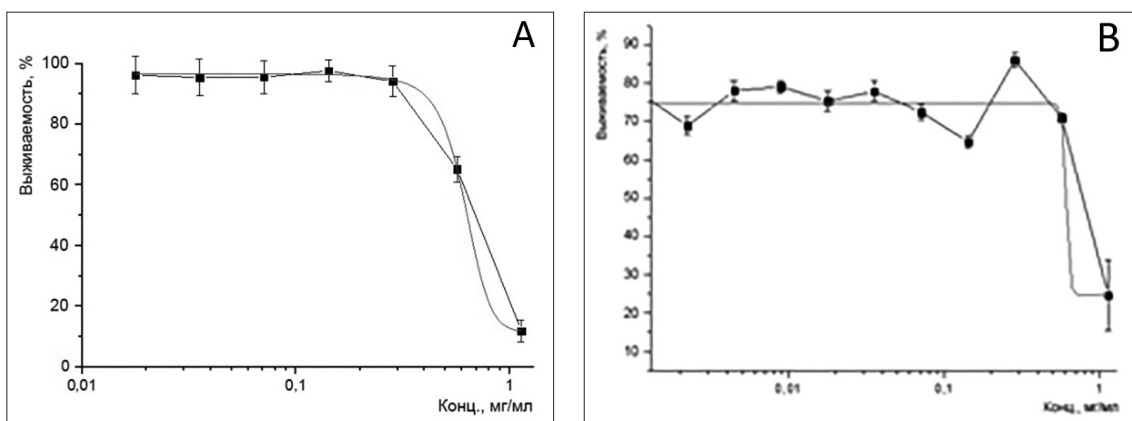


Рис. 1. Цитотоксическая активность КЖ в отношении линии клеток MCF-7 (А) и HSF (В)

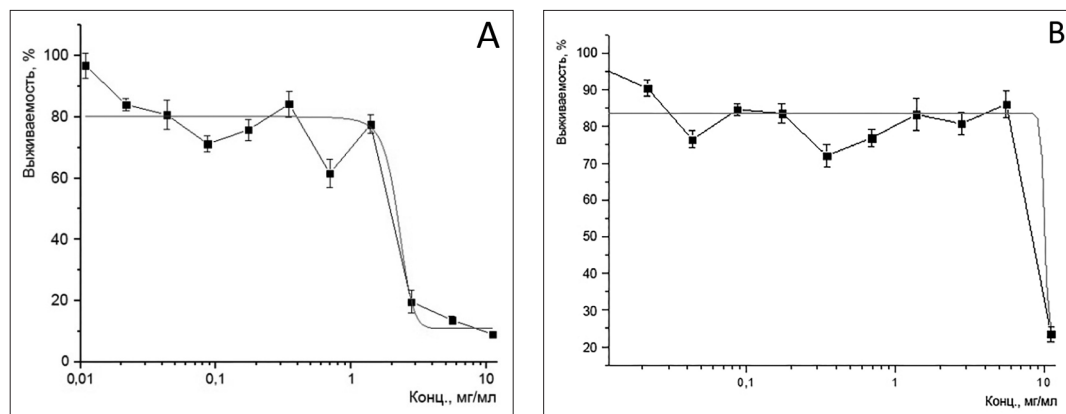


Рис. 2. Цитотоксическая активность ЭАФ в отношении линии клеток MCF-7 (А) и HSF (В)

Таблица 1

Результаты МТТ-теста

Исследуемые метаболиты, мг/мл	Клеточные линии	
	MCF-7, IC ₅₀ (мг/мл)	HSF, IC ₅₀ (мг/мл)
КЖ	0,6±0,04	0,9±0,04
ЭАФ	2,2±0,03	9,2±0,07

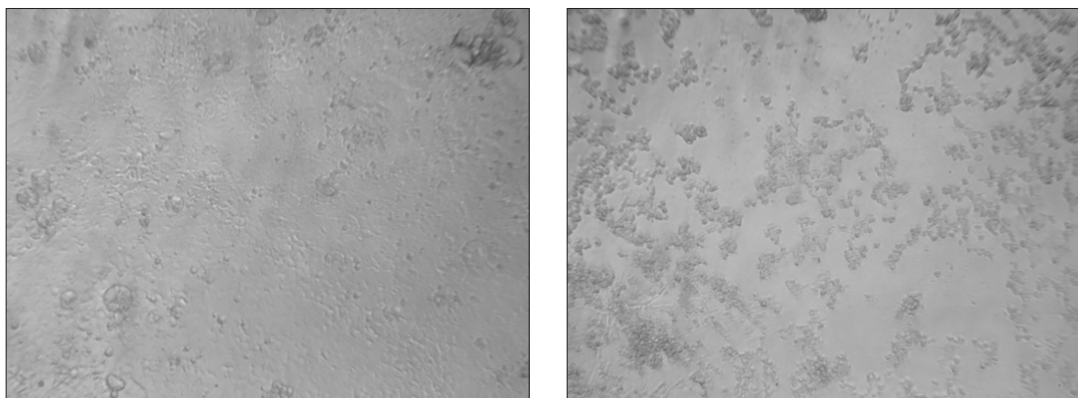


Рис. 3. Слева направо: клетки MCF-7, выращенные без добавления КЖ (контроль); MCF-7+КЖ (1,137 мг/мл)

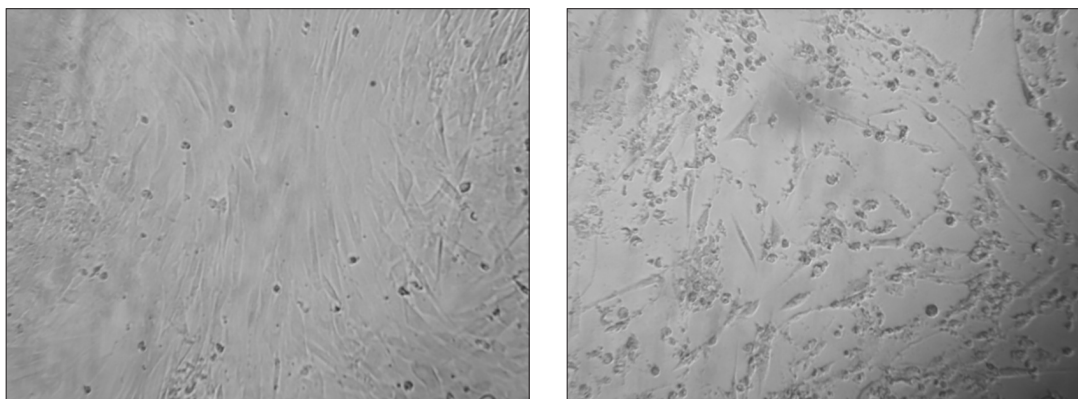


Рис. 4. Слева направо: клетки HSF, выращенные с добавлением этилацетата (контроль); HSF + ЭАФ (11,109 мг/мл)

Характер кривых выживаемости (см. рис. 1 и 2) показывает очень быстрые изменения в чувствительности клеток к пептидным вторичным метаболитам. Это можно объяснить наличием действующего агента до достижения некой критической величины, когда и проявляется выраженная цитотоксичность. Для пептаиболов это может выражаться в накоплении количества пептидов, критического для формирования пор в мембране.

Исследование морфологии клеточных культур после совместной инкубации исследуемых клеток с КЖ и ЭАФ показало, что большинство изучаемых клеток начинает конденсироваться, уменьшаться в размерах, приобретая округлую форму, обособляться, теряя контакты между собой, происходит разрушение клеточных мембран, количество погибших клеток увеличивается, клетки начинают гибнуть (рис. 3 и 4). Таким образом, наше исследование показало угнетение роста и гибель клеток под действием КЖ и ЭАФ. При этом быстро пролиферирующие клетки MCF-7 были более восприимчивы к действию вторичных метаболитов гриба.

В ходе эксперимента было отмечено, что скорость пролиферации клеток в экспоненциальной фазе роста MCF-7 составила 30 часов/деление, тогда как HSF — 60 часов/деление.

Предположительно *Trichoderma asperellum* F-1087 синтезирует смесь вторичных метаболитов, среди которых нельзя исключать пептаиболы [12]. В таком случае гибель клеток происходит вероятнее всего путем мембрано-модифицирующей активности, приводящей к образованию пор в мембране [10].

Оба метода — МТТ и морфологический анализ — показали сходные результаты по повышенной чувствительности против MCF-7 клеток. Полученные нами данные открывают дорогу для дальнейшего исследования вторичных метаболитов *Trichoderma asperellum* F-1087 в качестве противораковой терапии.

Заключение

Изучение цитотоксичности в культурах клеток к действию метаболитов *Trichoderma asperellum* F-1087 методом МТТ-теста показало, что метаболит оказывает дозозависимый аккумулятивный цитотоксический эффект в отношении линий клеток РМЖ (MCF-7) и фибробластов кожи человека (HSF). Наиболее выраженное цитотоксическое действие проявляет мета-

болит, содержащийся в КЖ самого грибка, на клетки MCF-7 ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,04$ мг/мл).

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель М.А. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2010. — Т. 21. — С. 52–117.
2. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Рогожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из средней Сибири // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 5. — № 3. — С. 340–347.
3. Ahluwalia V., Kumar J., Rana V.S., et al. Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity // Nat. Prod. Res. — 2015. — Vol. 29(10). — P. 914–920.
4. Basham V.M., Lipscombe J.M., Word J.M. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer // Breast Cancer Res. — 2002. — Vol. 4(1). — P. 2–4.
5. Demain A.L., Fang A. The natural functions of secondary metabolites // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. — 2000. — Vol. 69. — P. 1–39.
6. Hermosa R., Cardoza R.E., Rubio M.B., Gutiérrez S., Monte E. Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34 // The Open Mycology Journal. — 2014. — Vol. 8. — P. 127–139.
7. Hoffmeister D., Keller N.P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation // Natural Product Reports — 2007. — Vol. 24. — P. 393–416.
8. Keller N.P., Hohn T.M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi // Fungal Genet. Biol. — 1997. — Vol. 21. — P. 17–29.
9. Mather J.P. and Roberts P.E. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. — New York: Plenum Press, 1998. — Xv + 241 p.
10. Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation // Trends Genet. — 2010. — Vol. 26. — P. 449–457.
11. Twentyman P.R., Luscombe M.A. Study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity // Br. J. Cancer. — 1987. — Vol. 56(3). — P. 279–285.
12. Zalyalyutdinova L.M., Bikmullin A.G., Tukhbatova R.I., et al. Isolation, purification and biological activity of secondary metabolites from *Trichoderma asperellum* F-1087 // Applied Biochem. and Microbial. — 2018. — Vol. 54(2). — P. 211–214.

THE STUDY OF THE SELECTIVE CYTOTOXICITY OF THE METABOLITE *TRICHODERMA ASPERELLUM* F-1087 IN A HUMAN CANCER CELL LINE

L.M. TIMERBULATOVA², Rin.S. MUHAMMADIEV¹, Rish.S. MUHAMMADIEV¹,
V.V. BIRYULYA¹, A.A. NABATOV³, T.V. BAGAEVA²

¹ *Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety,*

² *Kazan (Volga) Federal University,*

³ *Volga State Academy of Physical Culture, Sports and Tourism, Kazan*

Breast cancer in the structure of morbidity and mortality in the female population remains the leading oncopathology both in Russia and in the world. Therefore, there is an acute problem of finding new methods of drug therapy against this disease. In this work, we isolated secondary peptide metabolites produced by the F-1087 strain and studied their cytotoxic activity on the MCF-7 human breast cancer cell line and on human skin fibroblast cells – HSF. A more pronounced effect was shown against rapidly proliferating MCF-7 cells ($IC_{50}=0.6\pm 0.04$ mg/ml) compared to HSF ($IC_{50}=0.9\pm 0.04$ mg/ml). Thus, a therapeutic potential against rapidly proliferating cancer cells was detected in an isolated peptide metabolite.

Keywords: secondary metabolites, *Trichoderma asperellum*, MCF-7, HSF.

ВОЗМОЖНОСТИ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТОКСИЧНОСТИ ПРИОРИТЕТНЫХ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ В СИСТЕМЕ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ

М.А. КОЗЛОВА*

ФГБУН Институт водных проблем Российской академии наук, Москва

По результатам работы показано, что для информационной поддержки проведения оценки экологических рисков целесообразно использование различных информационных технологий, позволяющих для индивидуальных соединений систематизировать сведения по их физико-химическим, а, главное, токсическим свойствам. Подготовлена база данных, включающая в себя международные списки приоритетных загрязняющих веществ, отечественные нормативные документы, а также международные базы данных. Приведены конкретные примеры оценки экологической опасности, а также биологической активности индивидуальных приоритетных загрязняющих веществ.

Ключевые слова: контроль качества водной среды, оценка риска, информационные технологии, прогноз токсичности, приоритетные загрязняющие вещества.

Введение

Органические соединения представляют собой подавляющую часть ксенобиотиков, среди которых можно выделить канцерогены, мутагены, эмбриотоксины, наиболее сильнодействующие яды и соединения, проявляющие иные виды токсичности. Органические соединения можно классифицировать по следующим основным критериям:

- по химической структуре;
- по происхождению;
- по степени опасности;
- по функциональному назначению.

Разнообразие и большая численность загрязняющих веществ делают практически невозможным контроль над содержанием каждого из них в объектах окружающей среды. Поэтому среди множества химических веществ выделяют те, которые производятся в крупных масштабах (больше 1000 кг/год) и которые представляют особую опасность для различных экосистем. Эту группу соединений принято называть приоритетными загрязняющими веществами [3].

Приоритетными обычно считают вещества, имеющие следующие характеристики:

- широкое распространение вещества и уровни его воздействия, способные вызвать неблагоприятные изменения в состоянии здоровья населения;
- устойчивость токсического вещества к воздействию факторов окружающей среды, его накопление в организме, включение в пищевые цепи или в природные процессы циркуляции веществ;
- частоту и тяжесть неблагоприятных эффектов, наблюдаемых в состоянии здоровья населения при воздействии токсического агента; при этом особенно важны необратимые или длительно протекающие изменения в организме, приводящие к генетическим дефектам, или другие нарушения развития у потомства;
- постоянный характер действия;
- изменение (трансформацию) химического вещества в окружающей среде или организме человека, приводящее к образованию продуктов, имеющих большую, чем исходное вещество, токсичность для человека.

К числу приоритетных органических веществ обычно относят пестициды, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), хлорорганические соединения (ХОС), нефтепродукты, фенолы, детергенты, нитраты. Кроме того, в последнее десятилетие активно рассматриваются лекарственные вещества и

© 2019 г. Козлова М.А.

* **Автор для переписки:**

Козлова Мария Алексеевна

кандидат географических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН Институт водных проблем Российской академии наук
(ИВП РАН)

E-mail: mblshok@mail.ru,

их метаболиты, попадающие в окружающую среду и оказывающие зачастую непредсказуемое воздействие на человека и биоту.

Если в России при оценке качества вод ориентируются на предельно допустимые концентрации (ПДК) веществ для водоемов различного назначения, то за рубежом многие страны переходят на риск-ориентированный подход в системе регулирования рынка химической продукции.

В 2007 г. Европейская Комиссия утвердила новую систему регулирования производства, размещения на рынке и использования химических веществ (REACH). Система нацелена на контроль за оборотом химических веществ и минимизацию вреда от их использования для здоровья человека и окружающей среды. Одним из основных требований REACH является возложение ответственности за оценку рисков и опасности химических веществ на производителей и поставщиков. Они обязаны провести оценку безопасности для здоровья человека и окружающей среды (в том числе водные объекты) химических веществ, которые поставляют на рынки стран ЕС в составе продукции или в чистом виде, в случае, если их количество больше одной тонны [2].

Подход к оценке экологической безопасности вещества включает в себя оценку опасности, оценку воздействия и характеристику риска. На основании результатов такой оценки определяется необходимость разработки дополнительных мер контроля для снижения рисков. Оценка проводится на основании набора первичных данных о физико-химических и токсикологических свойствах вещества, миграционном цикле в окружающей среде и его экологической опасности, а также информации об основных направлениях и условиях использования исследуемого вещества [1].

Таким образом, встает вопрос, как можно провести первичную оценку опасности органических приоритетных загрязнителей, неизбежно попадающих в объекты окружающей среды.

Материалы и методы

Для информационной поддержки проведения оценки экологических рисков было предложено использовать информационные технологии двух типов: базы данных (БД), включающие в себя экспериментальные сведения о характеристиках веществ, и прогнозные методы расчета биологической активности соединений.

Среди баз данные можно выделить:

- 1) Национальные и международные списки приоритетных токсичных веществ (например, Национальный перечень приоритетных веществ США (CERLA) Агентства по токсичным веществам и регистрации заболеваний — <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>).
- 2) Базы данных веществ с указанием их биологической активности (например, краткие международные документы по оценке химических веществ (CICADs) Всемирной организации здравоохранения — <http://www.inchem.org/pages/cicads.html>).
- 3) Базы данных веществ с указанием опасных свойств веществ (например, базы данных по химическим веществам в окружающей среде Международной программы по химической безопасности — <http://www.inchem.org/> или портал TOXNET, содержащий БД по токсикологии, по опасным химическим веществам, по состоянию окружающей среды и токсичным выбросам — <http://toxnet.nlm.nih.gov/>).
- 4) Базы данных веществ с указанием комплексных показателей (например, зависимости воздействия веществ на гены человека и развития болезней — Comparative Toxicogenomics Database, Сравнительные токсикогеномические базы данных — <http://ctd.mdibl.org/>).
- 5) Базы данных веществ с указанием физико-химических характеристик с последующим расчетом биологической активности веществ по полуэмпирическим формулам (например, NIST Chemistry WebBook — <http://webbook.nist.gov/>).

В настоящее время существует несколько компьютерных программ, основанных на дескрипторном анализе, — наиболее перспективном компьютерном методе, где по похожести структур веществ с неизвестной и известной биологической активностью или с совокупностью известных соединений и статистической оценкой сходства путем описания анализируемой молекулы и веществ из обучаемой выборки дескрипторами описываются отдельные части молекулы на формализованном языке. Сравнение функционала программ применительно к оценке опасности органических ксенобиотиков показало, что наиболее простой, понятной и эффективной является компьютерная программа PASS, которая позволяет проводить первичный качественный анализ опасности практически любого органического соединения.

Современная версия компьютерной программы PASS 2014 прогнозирует 7157 активностей на осно-

ве данных о 959801 соединении. Средняя точность предсказания, рассчитанная по методу исключения по одному, составляет 94,1%. Список прогнозируемых PASS видов биологической активности включает в себя основные и побочные фармакологические эффекты, биохимические механизмы действия, специфическую токсичность, нежелательные мишени и эффекты, связанные с метаболизмом, транспортом и влиянием на экспрессию генов. Детальное описание того, как представляется в программе информация о биологической активности и структурной формуле соединения, алгоритме оценки спектра активности, подготовке обучающей и тестовых выборок, оценке точности прогноза и интерпретации полученных результатов прогноза, можно найти в публикациях [4, 5].

Биологическая активность (БА) описывается в PASS качественно («активное» или «неактивное») в виде спектра активности органического соединения — множества различных терминов видов БА, описывающих результат взаимодействия вещества с различными биологическими объектами. Спектр отражает «внутренние», присущие данному соединению свойства, зависящие только от его химического строения. В PASS принимается, что вещество не обладает теми видами биологической активности, которые не указаны в его спектре, хотя и нельзя исключить ситуации, когда информация о каком-либо свойстве вещества не была найдена в доступных

источниках, либо оно обладает некоторой активностью, но на нее вещество еще не испытывалось [4, 5].

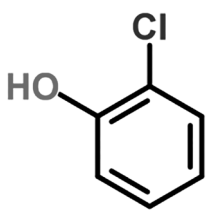
Методы на основе обучающей выборки позволяют также прогнозировать некоторые количественные характеристики токсичности. Например, по программе GUSAR можно провести расчет следующих экотоксикологических показателей — фактора биоаккумуляции, LD₅₀ (средняя смертельная концентрация для дафнии и гольяна), IGC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования роста) для инфузории *Tetrahymena pyriformis*, а также показателя острой токсичности LD₅₀ для крыс (при разном способе введения в организм). Химическая структура вещества в GUSAR представлена дескрипторами, используемыми в программе PASS, и дескрипторами биологической активности, которые основаны на результатах прогнозирования в программе PASS [6].

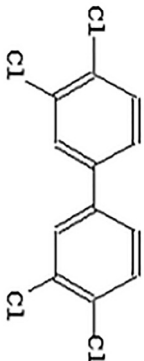
Результаты и обсуждение

Использование приведенных выше баз данных и регистров дает возможность аккумулировать имеющуюся информацию об экспериментально установленных опасных свойствах загрязняющих веществ. Как пример в таблице 1 представлены сведения об экологической опасности двух хлорорганических соединений, которые часто обнаруживаются в сточной и природной воде.

Таблица 1

Экспериментальные данные об опасности соединений из международных баз данных и регистров

Название / № CAS / формула	Токсичность соединения (источник сведений и данные)
2-хлорфенол CAS 95-57-8 	<p><i>Перечень предельно допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней воздействия вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов. Разработан Комитетом РФ по рыболовству.</i> ПДК 0,0001 мг/л, класс опасности 1</p> <p><i>Национальный перечень приоритетных веществ США — CERLA.</i> Входит в список</p> <p><i>Список приоритетных загрязняющих веществ EPA.</i> Входит в список</p> <p><i>Международные карты химической безопасности — The International Chemical Safety Cards (ICSCs).</i> При вдыхании: кашель, одышка, боли в горле, симптомы могут быть отсроченными. При попадании на кожу: может проникать через кожу, покраснение, боль. При попадании в глаза: покраснение, боль, неясность зрения. При проглатывании: боль в животе, сонливость, слабость, судороги. Влияние на окружающую среду: вещество токсично для гидробионтов. Вещество может вызвать долговременные изменения в водной экосистеме.</p>

	<p><i>Бельгийская поисковая система карт химической безопасности (ChemExpert).</i> Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями. Вредное при попадании на кожу. При проглатывании является вредным. Наносит вред при вдыхании</p> <p>Hazardous Substances Data Bank (HSDB) — банк данных опасных веществ. При приеме внутрь происходит нарушение дыхания, артериального давления, диуреза. Возможна лихорадка. Происходит усиление деятельности кишечника. Мышечная слабость, ведущая к судорогам, смерти. Наносит вред легким, печени, почкам, при контакте — коже. Возможны расстройства ЖКТ, ЦНС, тяжелая депрессия, коллапс, отек легких. LD₅₀ для крыс при оральном введении 670 мг/кг. LD₅₀ для крыс при подкожном введении 950 мг/кг. LD₅₀ для мышей при оральном введении 670 мг/кг</p>
<p>3,3',4,4'-ТХБ CAS 32598-13-3</p> 	<p><i>Список химических веществ, перечисленный в приложении III к Роттердамской конвенции</i> Стойкий в окружающей среде, биоаккумулируется в пищевой цепи человека, вреден для здоровья человека, хронически токсичен. Острая токсичность: LD₅₀ при оральном введении крысе 4–10 г/кг. Воздействует на репродуктивную систему, тератоген, наносит вред печени. Канцероген для животных, возможный канцероген для человека. IARC класс II</p> <p>Hazardous Substances Data Bank (HSDB) — банк данных опасных веществ У людей кожные эффекты включают в себя эритематозные высыпания с зудом, острый экзематозный контактный дерматит, ощущение жжения и отек лица и рук, утолщение кожи, пигментацию кожи и ногтей, чрезмерные выделения из глаз, отек век. Влияет на печень, при этом симптомы включают в себя тошноту, рвоту, потерю веса, желтуху, отеки и боль в животе. Влияет на ЦНС: головная боль, головокружение, депрессия, нервозность, мышечные и суставные боли. ЖКТ: сильные боли в животе, тошнота, рвота и диарея. Эмбриотоксикант.</p>

В таблице 2 приведены значения токсичности некоторых хлорорганических соединений, рассчитанные по компьютерной программе PASS (вероятность проявления активности выше 0,7). При этом в данной таблице указаны известные (экспериментально установ-

ленные) виды активности представленных соединений, поскольку все соединения содержались в обучающей выборке программы. В таблицах 3 и 4 показаны расчеты количественных характеристик опасности соединений по программе GUSAR.

Таблица 2

**Пример расчета токсических свойств по программе PASS
для некоторых хлорорганических соединений с указанием вероятности их проявления**

Название химического соединения	Известные активности из базы программы PASS	Результаты расчета с указанием вероятности проявления биологической активности
<p>2-хлорфенол CAS 95-57-8</p>	<p>Токсичное Эмбриотоксичное Канцероген Канцероген, группа 2B</p>	<p>0,800 Депрессант 0,752 Вызывает гиперхолестеринемию 0,756 Рвотное 0,709 Вызывает гипергликемию 0,707 Нейротоксичное</p>
<p>2,4-дихлорфенол CAS 120-83-2</p>	<p>Токсичное Эмбриотоксичное Тератогенное Канцероген Вызывает раздражение кожи Немутагенное, сальмонелла Вызывает сильное раздражение глаз Вызывает сильное раздражение кожи</p>	<p>0,821 Депрессант 0,743 Вызывает среднее раздражение глаз 0,775 Рвотное 0,742 Вызывает гиперхолестеринемию 0,724 Канцероген, группа 2B 0,710 Нейротоксичное</p>

2,4,5-трихлорфенол CAS 95-95-4	Антибактериальное Токсичное Эмбриотоксичное Канцероген Мутагенное Антибиотик Мутагенное, сальмонелла Антисептик	0,787 Депрессант 0,747 Эмбриотоксичное 0,713 Тератогенное
1,2,3,6,7,8-ГкХДД CAS 57653-85-7	Токсичное Эмбриотоксичный Тератоген Канцероген Канцероген, группа 3 Среднее раздражение глаз	0,945 Вызывает среднее раздражение глаз 0,851 Канцероген, группа 3 0,833 Канцероген 0,798 Эмбриотоксичный 0,794 Тератоген 0,721 Токсичное

Таблица 3

**Пример расчета значений LD₅₀ для крыс и мышей при разных способах введения
для некоторых хлорорганических соединений**

№ п/п	Название соединения	Значение LD ₅₀ , мг/кг							
		внутрибрюшинное		внутривенное		оральное		подкожное	
		мыши	крысы	мыши	крысы	мыши	крысы	мыши	крысы
1	2,4,5-трихлорфенол	153,48	254,25	61,14	91,61	550,25	547,84	216,95	791,69
2	2,4-дихлорфенол	200,07	384,85	59,52	89,06	670,33	685,47	304,08	956,51
3	2-хлорфенол	204,32	351,08	55,85	55,99	537,66	673,76	219,18	867,97
4	Пентахлорфенол	103,86	182,70	64,54	134,35	595,03	---	287,57	370,29
5	1,2,3,6,7,8-ГкХДД	398,31	57,44	72,93	52,10	971,68	---	888,02	918,80
6	1,2,3,7,8,9-ГкХДД	399,97	58,63	72,90	52,09	972,13	---	818,51	943,24
7	1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	370,09	87,86	87,20	56,42	1772,56	---	980,40	971,86
8	ОХДД	---	338,00	118,28	94,56	2678,69	742,37	1684,70	574,15
9	3,3',4,4'-ТХБ	345,28	1236,14	136,83	101,38	1791,30	2408,62	719,73	1430,76
10	3,4,4',5-ТХБ	587,18	544,09	97,56	78,84	1560,16	2104,11	498,39	1584,78

Примечание: «---» — результаты расчета не входят в область применимости модели

Таблица 4

Пример расчета показателей экологической токсичности для хлорорганических соединений

Название соединения	Фактор биоаккумуляции	LC ₅₀ для <i>Daphnia magna</i> (мг/л)	LC ₅₀ для гольяна (мг/л)	IGC ₅₀ для инфузории <i>Tetrahymena pyriformis</i> (г/л)
2,4,5-трихлорфенол	31656,08	2,74	1938,46	3,62
2,4-дихлорфенол	6826,33	4,22	6182,83	12,39
2-хлорфенол	2500,95	5,79	18711,38	40,65
Пентахлорфенол	161970,68	3,42	201,57	0,99
1,2,3,6,7,8-ГкХДД	4365383,75	0,13	2,38	0,04
1,2,3,7,8,9-ГкХДД	4508399,86	0,13	2,46	0,04
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	1171390,38	0,12	0,93	0,06
ОХДД	551471,24	0,28	0,16	0,06
3,3',4,4'-ТХБ	41634,34	3,03	1014,97	10,73

Таким образом, практически для любого органического вещества возможно собрать достаточную информацию для первичной оценки его опасных свойств, включая некоторые количественные экотоксикологические характеристики. Данный подход позволяет уже на первом этапе анализа качества водной среды сосредоточиться на наиболее опасных веществах, даже на таких, для которых нормативно не установлены значения ПДК, чтобы в дальнейшем проанализировать источники их поступления и мероприятия по уменьшению их содержания.

Заключение

В условиях постоянного роста антропогенного воздействия на объекты окружающей среды, в том числе водную, необходимо иметь разнообразную и детальную информацию о ее фактическом состоянии и о соединениях, ее загрязняющих. Поэтому для установления новых качественных или количественных данных о видах биологической активности и концентрационных порогах определенных токсических эффектов соединений, а также для информационной поддержки проведения оценки экологических рисков необходимо использовать информационные технологии, включая расчетные методы прогноза биологической активности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-05-00842.

Литература

1. *Аджиенко Г.В., Веницианов Е.В.* Риск-ориентированный подход в системе природоохранного регулирования: российский и международный опыт // *Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение.* – 2018. – № 2. – С. 4–13.
2. *Веницианов Е.В., Аджиев Г.В., Возняк А.А., Чиганова М.А.* Современные проблемы оценки, регулирования и мониторинга качества поверхностных вод // *Водное хозяйство России: проблемы, технологии, управление.* – 2018. – № 1. – С. 47–59.
3. *Фруммин Г.Т.* Экологическая токсикология (экотоксикология). Курс лекций. – СПб.: РГГМУ, 2013. – 179 с.
4. *Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* – 2014. – Vol. 50(3). – P. 444–457.
5. *Filimonov D.A., Poroikov V.V.* Probabilistic approach in activity prediction / In: *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening.* – Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008. – P. 182–216.
6. *Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V.* QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction // *Molecular Informatics.* – 2011. – Vol. 30. – P. 241–250.

POSSIBILITIES OF INFORMATION TECHNOLOGY FOR FORECAST THE TOXICITY OF PRIORITY POLLUTANTS OF WATER BODIES IN THE SYSTEM OF ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT

M.A. KOZLOVA

Institute of Water Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow

According to the results of the work, it was shown that for informational support of environmental risk assessment it is advisable to use various information technologies that allow for individual compounds to systematize information on their physico-chemical, and most importantly, toxic properties. A database was prepared, including international lists of priority pollutants, domestic regulatory documents, as well as international databases. Concrete examples of environmental hazard assessment, as well as the biological activity of individual priority pollutants, are given.

Keywords: water quality control, risk assessment, information technologies, toxicity prediction, priority pollutants.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ДЕФОСФАТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОСФАТАККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А.Р. ХАБИБУЛЛИНА*, Т.В. ВДОВИНА, А.С. СИРОТКИН, Й.В. КОБЕЛЕВА

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский университет», Казань

Проведено экспериментальное моделирование и исследование процесса фосфатаккумуляции с использованием микробных культур, выделенных из активного ила. Объектом исследования выступали фосфатаккумулялирующие микроорганизмы в составе изолятов А и Р, полученных из активного ила очистных сооружений г. Чистополь, по фенотипическим признакам отнесенные к бактериям родов *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, соответственно. Представлена сравнительная характеристика дефосфатирующей способности изолятов на основании расчета удельной дефосфатирующей способности каждой культуры.

Ключевые слова: фосфатаккумуляция, фосфатаккумулялирующие бактерии, дефосфатация, фосфат-ионы, фосфор, биологическая очистка, сточные воды.

Введение

Традиционная механобиологическая очистка городских сточных вод позволяет изъять из воды основную массу органических загрязняющих веществ, но не может обеспечить достаточную глубину удаления соединений азота и фосфора [3]. Биологическое удаление фосфора из сточных вод осуществляется, в основном, в ходе жизнедеятельности фосфатаккумулялирующих микроорганизмов (ФАО), которые потребляют фосфора значительно больше, чем необходимо для обеспечения собственного роста. Эти микроорганизмы используют дополнительный фосфор в качестве энергетического запаса, что позволяет им усваивать субстрат в анаэробных условиях [5].

При описании фосфорнакапливающих бактерий, главным образом, упоминаются р. *Acinetobacter*, однако таких бактерий в активном иле довольно много. Это — представители как широко распространенных родов *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Beggiatoa*, *Aeromonas*, *Zoogloea*, *Escherichia*, так и реже встречающихся *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Mycobacterium* и многих других [1].

Настоящая работа посвящена актуальной проблеме повышения эффективности биологической дефосфатации сточных вод с использованием бактерий в составе ак-

тивного ила очистных сооружений. Цель данной работы заключалась в оценке фосфатаккумулялирующей способности изолятов А и Р, выделенных из микробиоценоза активного ила очистных сооружений.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования включали в себя 2 этапа:

- выделение изолятов фосфатаккумулялирующих микроорганизмов;
- моделирование процесса фосфатаккумуляции в процессе периодического культивирования ФАО.

Объектом исследования выступали фосфатаккумулялирующие микроорганизмы в составе изолятов А и Р, выделенные из активного ила очистных сооружений г. Чистополь, по фенотипическим признакам отнесенные к бактериям родов *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, соответственно.

Выделение изолятов фосфатаккумулялирующих микроорганизмов из сообщества активного ила проводили высевом надильной жидкости, разбавленной в 10^7 раз, на плотные питательные среды с повышенным содержанием фосфора (в г на 1 л среды): глюкоза — 10, NaNO_3 — 3, K_2HPO_4 — 1, KH_2PO_4 — 0,5, MgSO_4 — 0,5, KCl — 0,5, FeSO_4 — 0,001, дрожжевой экстракт — 0,5, агар-агар — 20 [9].

Описание выделенных изолятов проводили на основании совокупности культуральных и морфологических признаков, а именно цвета, формы, края, наличия блеска колоний, размера клеток, окраски по Граму, взаимного расположения клеток, наличия спор.

© 2019 г. Хабибуллина А.Р., Вдовина Т.В., Сироткин А.С., Кобелева Й.В.

* Автор для переписки:

Хабибуллина Аида Рамилевна

аспирант кафедры промышленной биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета

E-mail: aida_khabibullin@mail.ru

Исследование дефосфатации сточной воды проводилось с использованием выделенных изолятов фосфатаккумулярующих микроорганизмов; при этом в качестве образца сточной воды выступал её модельный раствор следующего состава (в г на 1 л среды): пептон из мяса – 0,27, KH_2PO_4 – 0,028, NaCl – 0,007, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,004, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0026 [8].

Эффективность дефосфатации с использованием фосфатаккумулярующих микроорганизмов оценивали на основании определения содержания фосфатов в питательной среде в процессе культивирования. Определение фосфат-ионов проводили по стандартной методике [6].

Концентрацию растворенного кислорода определяли потенциометрически с помощью оксиметра UR-70410 («ULAB», Китай).

Поскольку среда для моделирования процесса фосфатаккумуляции имеет состав, отличный от среды для выделения изолятов, перед проведением эксперимента необходимо адаптировать микроорганизмы к среде. С этой целью за 24 часа до начала эксперимента изоляты культивировали в модельном растворе на перемешивающем устройстве ПЭ-6410 («Экрос», Россия) со скоростью перемешивания 110 об/мин. при температуре 24 ± 1 °С, соответствующей условиям дальнейшего эксперимента.

После адаптации изолятов для проведения эксперимента их инокулировали в свежую питательную среду аналогичного состава. Периодическое культивирование проводили в колбах объемом 500 мл при температуре 24 ± 1 °С, соответствующей условиям биологической очистки сточных вод. Инокулят вносили в количестве 10% от объема питательной среды. Для определения числа КОЕ методом Коха осуществляли высев на мясопептонный агар [4]. Число колоний в питательной среде после инокуляции

составляло в среднем 5×10^9 КОЕ/мл и 4×10^9 КОЕ/мл для бактерий в составе изолятов А и Р, соответственно. Согласно работам, посвященным исследованию процесса фосфатаккумуляции [8], в процессе экспериментальных исследований смену кислородного режима осуществляли в результате прекращения (возобновления) аэрации каждые 2 часа на протяжении 6 часов. Для создания системы с принудительной аэрацией в стерильных условиях культивирования использовали компрессор SB-348A («BARBUS», Китай), воздушные фильтры Midisart 2000 («Sartorius», Германия) с размером пор 0,2 мкм, способные выдержать до 20 циклов автоклавирования.

В каждой точке отбора проб осуществляли измерения концентрации растворенного кислорода, определение концентрации фосфат-ионов.

Статистическая обработка проводилась с использованием стандартных процедур пакета прикладных программ Microsoft Excel. Так, были использованы процедуры дисперсионного анализа с определением средней величины, стандартного отклонения, доверительного интервала, относительной погрешности.

Результаты

Описание микробных культур в составе выделенных изолятов проводили на основании комплекса культуральных и морфологических признаков. Колонии изолята А имели ровные края, молочный, желтоватый цвет, блеск; бактерии представляли собой грамтрицательные кокки [7]. Колонии изолята Р имели ровные края, светлый, почти прозрачный цвет, блеск; бактерии представляли собой грамтрицательные палочковидные клетки [7].

Результаты, полученные в процессе культивирования изолятов с использованием принудительной аэрации, представлены на рисунках 1, 2.

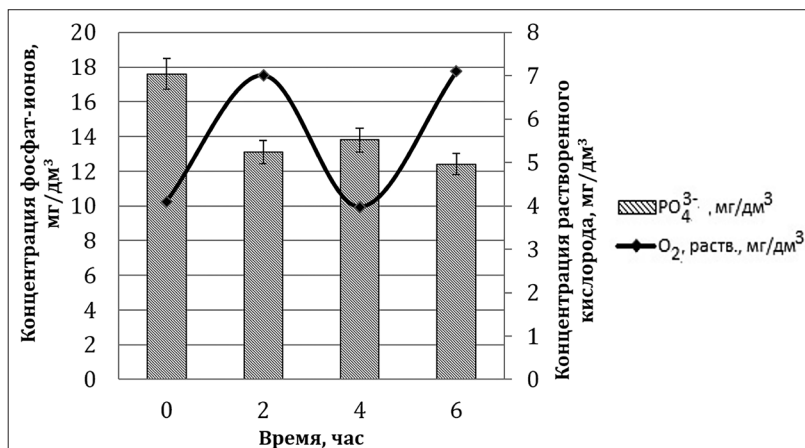


Рис. 1. Изменение концентраций фосфора фосфатов и растворенного кислорода в модельном растворе сточной воды в процессе периодического культивирования изолята А

Результаты, полученные в процессе экспериментальных исследований, соответствуют литературным данным о зависимости концентрации фосфат-ионов от концентрации растворенного кислорода в процессе биологической очистки сточных вод [2].

В условиях принудительной аэрации наблюдается снижение концентрации фосфатов на 26% от начального количества фосфатов на 2-й час культивирования изолята А. Уменьшение количества растворенного кислорода в среде на 3 мг/дм³ привело к незначительному высвобождению фосфора фосфатов (не более

5%) от концентрации фосфора фосфатов на втором часу культивирования. Дальнейшее возобновление аэрации способствовало интенсивному потреблению фосфора фосфатов ФАО в составе изучаемого изолята и снижению концентрации фосфора на 10% по сравнению с показателями четвертого часа культивирования. Общая эффективность удаления фосфора фосфатов в процессе периодического культивирования изолята А при моделировании изменения концентрации растворенного кислорода в диапазоне от 4 до 7 мг/дм³ составила около 30%.

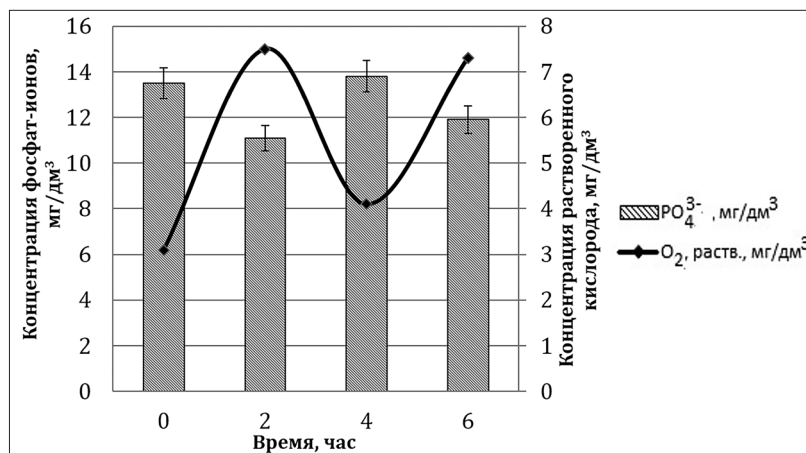


Рис. 2. Изменение концентраций фосфора фосфатов и растворенного кислорода в модельном растворе сточной воды в процессе периодического культивирования изолята Р

В условиях принудительной аэрации фосфат-ионы потребляются ФАО в составе изолята Р, что приводит к уменьшению их концентрации на 14% от начального содержания (2-й час культивирования). Снижение количества растворенного кислорода на 4 мг/дм³ привело к высвобождению фосфора фосфатов в количестве, равном 21% от концентрации фосфора фосфатов на втором часу культивирования. При дальнейшем возобновлении аэрации содержание фосфора фосфатов снижается на 13% по сравнению с показателями четвертого часа культивирования. Общая эффективность удаления фосфора фосфатов в процессе периодического культивирования изолята Р в условиях изменения концентрации растворенного кислорода в пределах 3–7 мг/дм³ составила приблизительно 10%.

При увеличении диапазона изменения концентрации растворенного кислорода в среде наблюдается увеличение эффективности протекания процесса дефосфатации модельной среды. Общая эффективность удаления фосфатов из среды для изолята А составляет приблизительно 30%, для изолята Р — 10%.

Для оценки дефосфатирующей способности выделенных изолятов был проведен расчет удельной

способности каждого изолята к биологическому удалению фосфатов. Значения удельной (отнесенной к числу КОЕ в инокуляте) дефосфатирующей способности изолятов А и Р составили $1,1 \times 10^{-10}$ и $0,3 \times 10^{-10}$, мг $\text{PO}_4^{3-} / (\text{дм}^3 \times \text{КОЕ})$, соответственно.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дефосфатирующей способности фосфатаккумулирующих изолятов А и Р. Общая эффективность удаления фосфатов составляет около 30% для изолята А и 10% для изолята Р. Значения удельной дефосфатирующей способности изолятов А и Р составили $1,1 \times 10^{-10}$ и $0,3 \times 10^{-10}$, мг/(дм³×КОЕ), соответственно. Сравнительно высокая дефосфатирующая способность выделенного из активного ила изолята А обуславливает необходимость молекулярно-биологической идентификации его микробного состава для дальнейшего изучения и интенсификации процесса фосфатаккумуляции и дефосфатации сточных вод. Полученные результаты свидетельствуют о возможности оптимизация процесса дефосфатации

сточных вод без принципиальных конструктивных изменений действующих очистных сооружений путем мягкого регулирования кислородного режима, что, в свою очередь, сопровождается снижением затрат на электроэнергию.

Литература

1. Асонов Н.Р. Микробиология. 3 изд., перераб. и доп. — М.: Колос, 1997. — 352 с.
2. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. — М.: АКВАРОС, 2003. — 512 с.
3. Маркевич Р.М., Рымовская М.В., Лазовская О.И., Холодинская Н.В. Биологическое удаление из сточных вод азота и фосфора в аэротенках Минской очистной станции аэрации // Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. — 2009. — Т. 1. — № 4. — С. 242–246.
4. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии: Учебн. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 608 с.
5. Пахомов А.Н., Стрельцов С.А., Козлов М.Н., Харьковина О.В. и др. Опыт эксплуатации сооружений биологической очистки сточных вод от соединений азота и фосфора // Водоснабжение и санитарная техника. — 2010. — № 10. — Ч. 1. — С. 35–41.
6. ПНД Ф 14.1:2.112-97 Методика измерений массовой концентрации фосфат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с молибдатом аммония. — М., 1997.
7. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи (т. 1, 2) — М.: «Мир», 1997. — 1168 с.
8. Günther S., Trutnau M., Kleinstaub S., Hause G., Bley T., Röske I., Harms H., Müller S. Dynamics of polyphosphate accumulating bacteria in waste water communities detected via DAPI and tetracycline labelling // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — Vol. 75(7). — P. 2111–2121.
9. Rokade K., Mali G. Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas desmolyticum* 2112 // International Journal of Pharma and Biosciences. — 2013. — Vol. 4(2). — P. 609–616.

INVESTIGATION OF DEPHOSPHATATION OF WASTEWATER USING PHOSPHATE-ACCUMULATING BACTERIA

A.R. KHABIBULLINA, T.V. VDOVINA, A.S. SIROTKIN, Y.V. KOBELEVA

Kazan National Research Technological University, Kazan

Experimental modeling and investigation of the phosphataccumulation process using microbial cultures insulated from activated sludge has been carried out. The objects of the study were isolates of phosphate-accumulating microorganisms: isolate A and isolate P, isolated from the active sludge community of the sewage treatment plant in the city of Chistopol, according to phenotypic traits referred to bacteria of the genera *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, respectively. A comparative characteristic of the dephosphating ability of isolates based on the calculation of the dephosphating ability of each culture is presented.

Keywords: phosphate accumulation, phosphate accumulating bacteria, dephosphatation, phosphate ions, phosphorus, biological treatment, wastewater.

СОВМЕСТНОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМЛОДИПИНА, РОЗУВАСТАТИНА И ЛИЗИНОПРИЛА В ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ

Т.С. КЫРОВА*, Ю.Б. ЕЛЬЧИЩЕВА

Пермский государственный национальный исследовательский университет

Настоящее исследование посвящено разработке совместного спектрофотометрического определения амлодипина, розувастатина и лизиноприла в комбинированном лекарственном препарате. Разработка спектрофотометрической методики является альтернативой ВЭЖХ определению действующих компонентов, которое основано на применении дорогостоящего и сложного в обращении оборудования. Разделение действующих веществ комбинированного препарата возможно за счет их разной растворимости в 0,1 М растворе HCl, хлороформе, воде и использовании органических красителей, которые избирательно реагируют с амлодипином, розувастатином и лизиноприлом. Определение амлодипина основано на реакции с бромкрезоловым пурпурным с образованием лимонно-желтого продукта. Лизиноприл избирательно реагирует с ализарином с образованием желто-оранжевого соединения. В основе определения розувастатина лежит взаимодействие с бромкрезоловым зеленым с образованием сине-голубого продукта. Для определения каждого действующего компонента препарата с органическими реагентами были найдены оптимальные условия комплексообразования: длина волны максимального светопоглощения, кислотность раствора; изучено влияние температурного фактора и избытка фотометрического реагента. В оптимальных условиях построены градуировочные графики, рассчитаны молярные коэффициенты светопоглощения. Разработанные методики были успешно применены для анализа лекарственного препарата Эквамер[®], содержащего амлодипин, лизиноприл и розувастатин.

Ключевые слова: амлодипин, лизиноприл, розувастатин, многокомпонентный препарат.

Введение

За последние 15 лет фармацевтический рынок в Российской Федерации стал развиваться огромными темпами, при этом политика импортозамещения направлена на увеличение доли отечественных аналогов [5]. Отечественные препараты должны быть эффективными и доступными для лечения граждан, поэтому государство устанавливает специальные нормы их качества (количественное содержание вещества, допустимое содержание примесей и др [4]), а также контролирует цены на реализацию. Другой тенденцией фармацевтического рынка в Российской Федерации является то, что крупные производители стараются выпускать комбинированные препараты. Такие препараты позволяют

пациенту принимать одну таблетку в сутки вместо трех или четырех.

На сегодняшний день основной тенденцией является разработка методов анализа, относительно безопасных для человека и окружающей среды [8], экономически выгодных, экспрессных, доступных в аппаратном исполнении, позволяющих проводить анализ многокомпонентных препаратов. Многие ВЭЖХ методики определения амлодипина, розувастатина и лизиноприла [10–15, 17] основаны на использовании дорогостоящих, пожароопасных и высокотоксичных реактивов, сорбентов и растворителей, а также дорогостоящего и сложного в аппаратном оформлении оборудования. Спектрофотометрическое определение удовлетворяет большинству из вышеперечисленных требований, предъявляемых к методам анализа многокомпонентного препарата.

Данная работа посвящена разработке спектрофотометрической методики совместного определения амлодипина (AML) (рис. 1), розувастатина (ROS) (рис. 2) и лизиноприла (Lis) (рис. 3) в комбинированном лекарственном препарате Эквамер[®].

© 2019 г. Кырова Т.С., Ельчищева Ю.Б.

* Автор для переписки:

Кырова Татьяна Сергеевна

студент кафедры аналитической химии и экспертизы химического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

E-mail: kyrovats@hotmail.com

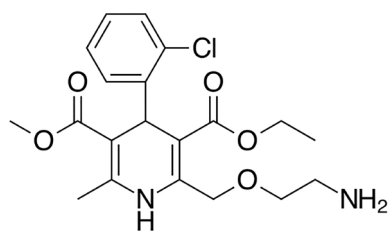


Рис. 1. Структурная формула молекулы амлодипина

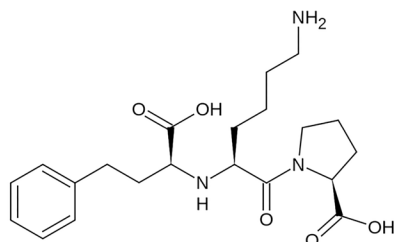


Рис. 2. Структурная формула молекулы лизиноприла

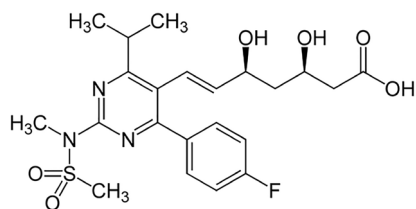


Рис. 3. Структурная формула молекулы розувастатина

Фармацевтическая комбинация из амлодипина — дигидропиридинового антагониста кальция, лизиноприла — ангиотензин превращающего фермента и розувастатина — эффективного представителя ряда статинов, является очень популярным препаратом для лечения сердечно сосудистых заболеваний [16]. Одним из его достоинств служит то, что пациент соблюдает четкий режим дозирования при проведении терапии.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы и растворы:

1. Стандартный раствор амлодипина — $T_{\text{AML}} = 0,41$ г/мл.
2. Стандартный раствор лизиноприла — $T_{\text{Lis}} = 2,03$ мг/мл.
3. Стандартный раствор розувастатина — $T_{\text{ROS}} = 1,01$ г/мл.
4. Стандартный раствор бромкрезолового пурпурного — $T_{\text{БКП}} = 0,28$ мг/мл.
5. Стандартный раствор ализарина — $T_{\text{ALZ}} = 0,24$ мг/мл.

6. Стандартный раствор бромкрезолового зеленого — $T_{\text{БКЗ}} = 0,69$ мг/мл.

7. Буферные растворы со значением рН: 7,68, 9,44 и 3,35.

Для оценки правильности методики были использованы таблетки препарата Эквамер[®] с содержанием, мг: амлодипина — 5,0, лизиноприла — 10,0 и розувастатина — 20,0.

Нагревание образцов проводилось в лабораторном термореакторе «ТЕРМИОН», охлаждение проводилось в криостате «КРИО-ВТ-01».

Спектры поглощения образующихся комплексных соединений были сняты на спектрофотометре СФ-2000. Спектрофотометрические исследования осуществляли на спектрофотометре Юнико-1201.

Результаты

Комбинированный препарат представляет собой многокомпонентную смесь, действующие вещества которого — амлодипин, лизиноприл и розувастатин растворимы в разных растворителях. Поэтому нами была разработана методика пробоподготовки, основанная на разделении действующих веществ фармацевтической комбинации за счет их разной растворимости в 0,1 М растворе HCl, хлороформе, дистиллированной воде.

Разделение активных компонентов препарата осуществлялось следующим образом: для извлечения розувастатина навеску анализируемого образца помещали в делительную воронку объемом 100 мл. Добавляли 25 мл H₂O дистиллированной воды и 25 мл хлороформа и встряхивали в течение 5 минут. После полного расслаивания органический слой, содержащий розувастатин, сливали в мерную колбу на 25 мл (раствор 1). Водный слой, содержащий Lis с AML, фильтровали через фильтр с синей лентой в мерную колбу на 25 мл (раствор 2, содержащий лизиноприл). Осадок вместе с фильтром обрабатывали 0,1 М раствором HCl с целью перевода амлодипина в раствор (раствор 3).

Определение амлодипина основано на реакции с бромкрезоловым пурпурным с образованием окрашенного продукта с максимумом поглощения $\lambda_{\text{max}} = 364$ нм. Максимальное светопоглощение комплексного соединения на фоне реагента и наибольшая контрастность реакции наблюдается при $\lambda = 364$ нм и рН=7,68 (рис. 4). Контрастность реакции составила 224 нм.

Следует отметить, что комплексообразование амлодипина с БКП сопровождается гипсохромным сдвигом и гиперхромным эффектом, что обычно не характерно для спектрофотометрических реакций.

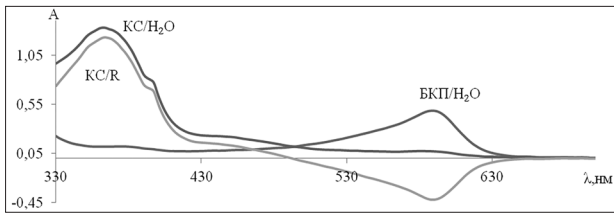


Рис. 4. Спектры поглощения реагента (БКП/Н₂О), комплексного соединения на фоне воды (КС/Н₂О) и комплексного соединения на фоне реагента (КС/Р) (СФ-2000, l=0,5 см, рН=7,68, С_{AML}=1·10⁻³ моль/л, С_{БКП}=1·10⁻³ моль/л)

Дальнейшим этапом работы было установление оптимальных условий [1, 3, 7, 9] реакции комплексообразования: оптимальное время развития окрашивания, влияние кислотности среды, температуры и избытка реагента.

Комплекс амлодипина с бромкрезоловым пурпурным образуется мгновенно и в течение 20 минут окраска остается стабильной (рис. 5). Поэтому оптимальное время для фотометрирования растворов (τ_{опт}) составляет 20 минут.

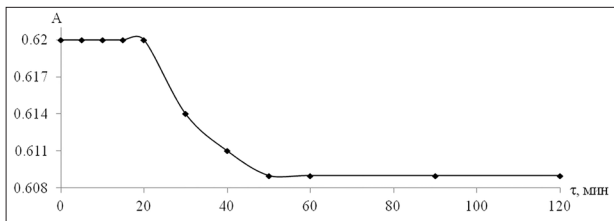


Рис. 5. График для определения оптимального времени развития окрашивания комплексного соединения АМЛ с БКП (Юнико-1201, λ=364 нм, l=0,5 см, рН=7,68, С_{AML}=1·10⁻³ М, С_{БКП}=1·10⁻³ М, n=9)

Влияние температурного фактора на процесс комплексообразования изучалось в интервале от 5 до 60 °С (табл. 1). Оптимальный температурный диапазон для максимального выхода продукта реакции составляет 20–25 °С.

При ранее проведенных исследованиях было установлено (см. рис. 4), что оптимальный рН комплексообразования составляет 7,68. В дальнейшем было проведено исследование влияния количества буферного раствора. Из полученных результатов (рис. 6) следует, что оптимальный объем буферного раствора для проведения фотометрической реакции составляет 6,0 мл.

Влияние количества реагента на комплексообразование амлодипина с бромкрезоловым пурпурным определяли методом насыщения [1, 3, 7, 9]. Оптимальный

объем реагента — 4 мл (рис. 7). Данное исследование также показывает молярное соотношение [AML: БКП], равное 1:2.

Таблица 1

Зависимость оптической плотности раствора комплексного соединения от температуры (Юнико-1201, λ=364 нм l=0,5 см, рН=7,68, С_{AML}=1·10⁻³ М, С_{БКП}=1·10⁻³ М)

T, °C	-5	10	20	25	40	60
A	0,706	0,725	0,768	0,787	0,732	0,604

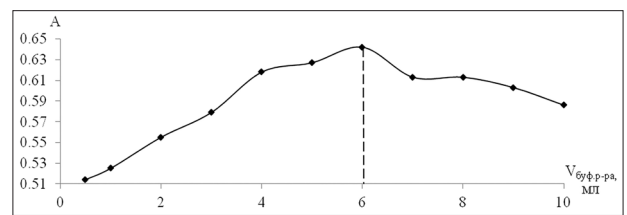


Рис. 6. График для определения оптимального объема буферного раствора для развития окрашивания комплексного соединения АМЛ с БКП (Юнико-1201, λ=364 нм l=0,5 см, рН=7,68, С_{AML}=1·10⁻³ М, С_{БКП}=1·10⁻³ М, n=9)

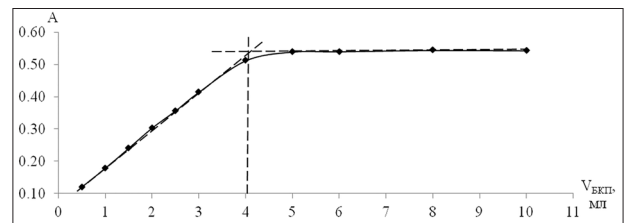


Рис. 7. График для определения оптимального объема раствора реагента (Юнико-1201, λ=364 нм, l=0,5 см, рН=7,68, С_{AML}=1·10⁻³ М, С_{БКП}=1·10⁻³ М, V_{AML}=2,0 мл, n=9)

В выбранных оптимальных условиях (λ_{max}=364 нм, рН=7,68, V_{буф.р-ра}=6,0 мл, V_{БКП}=4,0 мл) был построен градуировочный график для определения амлодипина с бромкрезоловым пурпурным (рис. 8). Закона Бугера — Ламберта — Бера выполняется в интервале 0,020–4,90 мг/25 мл. Кажущийся молярный коэффициент светопоглощения составил — ε=6215.

Определение лизиноприла основано на реакции с ализарином с образованием окрашенного продукта желто-оранжевого цвета. Максимальное светопоглощение комплексного соединения на фоне реагента и наибольшая контрастность фотометрической реакции наблюдаются при λ=433 нм и рН=9,44 (рис. 9).

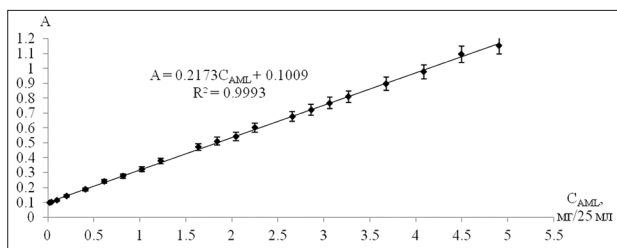


Рис. 8. Градуировочный график для определения амлодипина с БКП. (Юнико-1201, $\lambda=364$ нм, $l=0,5$ см, $\lambda=364$ нм, $\rho\text{H}=7,68$, $T_{\text{БКП}}=0,28$ мг/мл, $T_{\text{амл}}=0,41$ мг/мл, $n=9$)

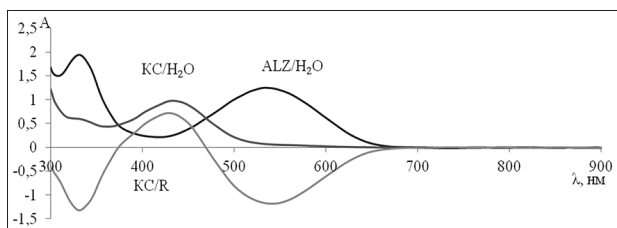


Рис. 9. Спектры поглощения реагента (ALZ / H₂O), комплексного соединения на фоне воды (КС / H₂O) и комплексного соединения на фоне реагента (КС / R) (СФ-2000, $l=0,1$ см, $\rho\text{H}=9,44$, $C_{\text{ALZ}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{Lis}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

Необходимо отметить, что при комплексообразовании лизиноприла с ALZ наблюдается гипсохромный сдвиг и гипохромный эффект. Контрастность реакции составляет 100 нм.

Следующим шагом в установлении оптимальных условий [1, 3, 7, 9] реакции комплексообразования было изучение: оптимального времени развития окрашивания, влияния кислотности среды, температуры и избытка реагента.

Реакция комплексообразования лизиноприла с ализарином протекает несколько медленнее, чем реакция комплексообразования амлодипина с бромкрезоловым пурпурным. Время развития окрашивания комплекса составляет 20 минут (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость комплексообразования от времени (Юнико-1201, $\lambda=433$ нм, $l=0,1$ см, $\rho\text{H}=9,44$, $C_{\text{ALZ}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{Lis}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $n=9$)

τ , мин	0	5	10	15	20	30	60	90	120
A	0,430	0,491	0,526	0,549	0,613	0,623	0,624	0,520	0,506

Оптимальный температурный диапазон для максимального выхода продукта реакции составляет 45–50 °C (табл. 3).

Таблица 3

Зависимость оптической плотности раствора комплексного соединения от температуры (Юнико-1201, $\lambda=433$ нм, $l=0,1$ см, $\rho\text{H}=9,44$, $C_{\text{ALZ}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{Lis}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $n=9$)

T, °C	-5	10	20	25	40	50	60	70
A	0,436	0,446	0,530	0,618	0,705	0,725	0,604	0,507

Определено оптимальное количество буферного раствора для проведения фотометрической реакции, которое составляет 4,0 мл (рис. 10).

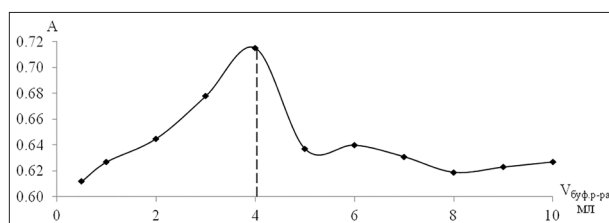


Рис. 10. График для определения оптимального объема буферного раствора для развития окрашивания комплексного соединения Lis с ALZ (Юнико-1201, $\lambda=433$ нм, $l=0,1$ см, $\rho\text{H}=9,44$, $C_{\text{ALZ}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{Lis}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $n=9$)

Оптимальный объем реагента при комплексообразовании лизиноприла с ализарином составляет 5,0 мл (рис. 11). Данный эксперимент подтверждает молярное соотношение компонентов в образующемся комплексном соединении, равное 1:2.

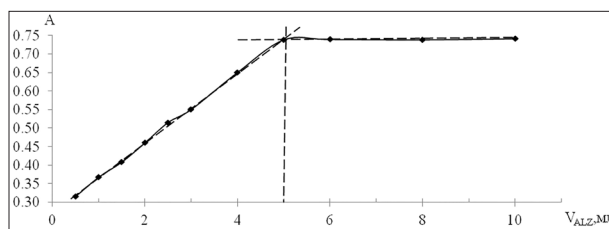


Рис. 11. График для определения оптимального объема раствора реагента (Юнико-1201, $\lambda=433$ нм, $l=0,1$ см, $\rho\text{H}=9,44$, $C_{\text{ALZ}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{Lis}}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $n=9$, $V_{\text{Lis}}=2,5$ мл)

Таблица 4

Зависимость оптической плотности раствора комплексного соединения от времени (Юнико-1201, $l=1,0$ см, $\lambda=610$ нм, $pH=3,35$, $C_{ROS}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{БКЗ}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $n=9$)

τ , мин	0	5	10	15	20	30	60	90	120
A	0,502	0,568	0,584	0,620	0,602	0,603	0,606	0,607	0,604

В выбранных оптимальных условиях был построен градуировочный график (рис. 12). По градуировочному графику был установлен интервал выполнения закона Бугера — Ламберта — Бера, который составил — 0,020–20,270 мг/25 мл.

Кажущийся молярный коэффициент светопоглощения (ϵ) равен 7494.

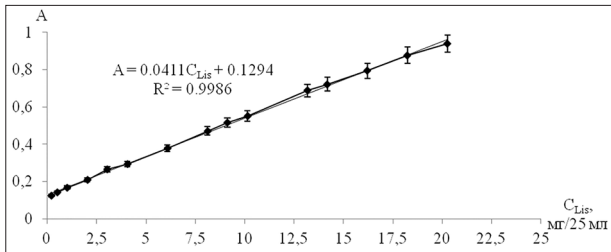


Рис. 12. Градуировочный график для определения лизиноприла с ALZ (Юнико-1201, $\lambda=433$ нм, $l=0,1$ см, $pH=9,44$, $T_{Lis}=2,03$ мг/мл, $T_{ALZ}=0,24$ мг/мл, $n=9$)

Розувастатин определяли на основе реакции с бромкрезоловым зеленым с образованием окрашенного продукта сине-голубого цвета. Максимум поглощения находится при $\lambda_{max}=610$ нм (рис. 13).

Максимальное светопоглощение комплексного соединения на фоне реагента и наибольшая контрастность фотометрической реакции наблюдается при $pH=3,35$. Отличительной особенностью этой фотометрической реакции является то, что при комплексообразовании розувастатина с бромкрезоловым зеленым наблюдаются батохромный сдвиг и гиперхромный эффект. Контрастность реакции составляет 176 нм.

Следующим этапом работы было установление оптимальных условий [1, 3, 7, 9] реакции комплексообразования: оптимальное время развития окрашивания, влияние кислотности среды, температуры и избытка реагента.

Комплекс розувастатина с бромкрезоловым зеленым образуется в течение 20 минут (табл. 4).

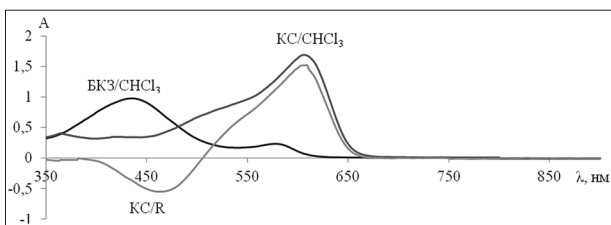


Рис. 13. Спектры поглощения реагента (БКЗ/ $CHCl_3$), комплексного соединения на фоне хлороформа (К/ $CHCl_3$) и комплексного соединения на фоне реагента (К/Р) ($СФ-2000$, $l=1,0$ см, $pH=3,35$, $C_{ROS}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{БКЗ}=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

Оптимальным температурным диапазоном для развития окрашивания комплексного соединения является 20–25 °С (рис. 14).

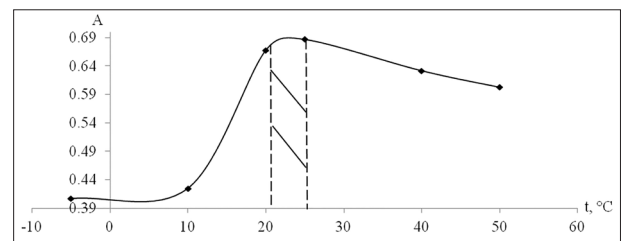


Рис. 14. График для определения оптимальной температуры развития окрашивания комплексного соединения ROS с БКЗ (Юнико-1201, $\lambda=610$ нм, $l=1,0$ см, $pH=3,35$, $C_{ROS}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{БКЗ}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $n=9$)

Максимальный выход продукта реакции наблюдается при оптимальном объеме буферного раствора, равным 5,0 мл (рис. 15).

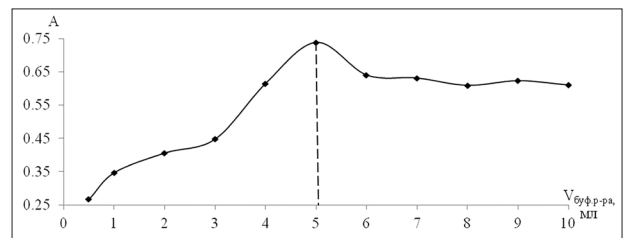


Рис. 15. График для определения оптимального объема буферного раствора комплексного соединения ROS с БКЗ (Юнико-1201, $l=1,0$ см, $\lambda=610$ нм, $pH=3,35$, $C_{ROS}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{БКЗ}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $n=9$)

Количество реагента, необходимое для полного связывания анализируемого вещества, определяли методом насыщения [1, 3, 7, 9]. Оптимальный объем составляет

5 мл (рис. 16). На основании этого эксперимента можно сделать вывод, что молярное соотношение компонентов в образующемся комплексном соединении равно 1:1.

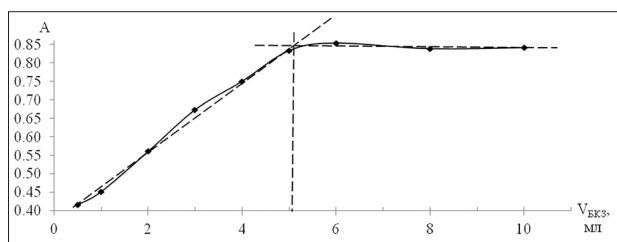


Рис. 16. График для определения оптимального объема раствора реагента (Юнико-1201, $\lambda=610$ нм, $l=1,0$ см, $\rho\text{H}=3,35$, $C_{\text{ROS}}=1\cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{БКЗ}}=1\cdot 10^{-3}$ М, $V_{\text{ROS}}=5,0$ мл, $n=9$)

В выбранных оптимальных условиях ($\rho\text{H}=3,35$, $\lambda_{\text{max}}=610$ нм, $V_{\text{буф. р-ра}}=5,0$ мл, $V_{\text{БКЗ}}=5,0$ мл) был построен градуировочный график (рис. 17).

Выполнение закона Бугера – Ламберта – Бера лежит в интервале 0,20–10,01 мг/25 мл. Кажущийся молярный коэффициент светопоглощения составляет 3000.

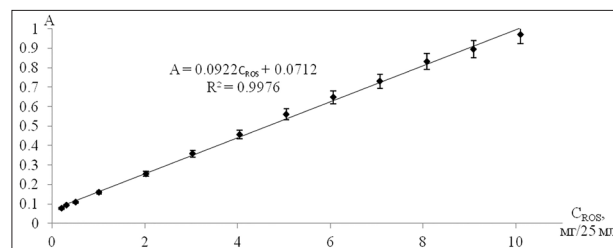


Рис. 17. Градуировочный график для определения розувастатина с БКЗ (Юнико-1201, $\lambda=610$ нм, $l=1$ см, $\rho\text{H}=3,5$, $T_{\text{БКЗ}}=0,69$ мг/мл, $T_{\text{ROS}}=1,01$ мг/мл, $n=9$)

Обсуждение

По вышеописанной методике пробоподготовки и определения действующих компонентов препарата спектрофотометрическим методом с использованием органических красителей нами был проведен анализ многокомпонентного лекарственного препарата Эквамер©, содержащего (мг) амлодипина – 5,0, лизиноприла – 10,0 и розувастатина – 20,0. Результаты представлены в таблице 5. Ошибка определения компонентов препарата не превышает 5%, что соответствует приемлемой ошибке метода [2, 6].

Таблица 5

Результаты анализа многокомпонентного лекарственного препарата Эквамер©

Название вещества	Истинное содержание, мг	Найденное содержание, мг
Амлодипин	5,00	4,89±0,09
		4,91±0,11
		4,96±0,07
Лизиноприл	10,00	9,93±0,05
		9,89±0,12
		9,95±0,09
Розувастатин	20,00	19,81±0,19
		19,84±0,16
		19,82±0,14

Заключение

На основании выполненного исследования можно сделать такие выводы:

1. В процессе исследования была разработана методика пробоподготовки, основанная на разной растворимости действующих компонентов препарата.
2. Разработаны спектрофотометрические методики определения амлодипина, лизиноприла, розувастатина с помощью соответствующих органических красителей: БКП, АЛЗ, БКЗ.
3. Найденны оптимальные условия для протекания фотометрических реакций:

- оптимальные условия комплексообразования амлодипина с бромкрезоловым пурпурным: $\rho\text{H}=7,68$, $\lambda_{\text{max}}=364$ нм, $V_{\text{буф. р-ра}}=6,0$ мл, $V_{\text{БКП}}=4,0$ мл, $t=25$ °С;
- оптимальные условия комплексообразования лизиноприла с ализарином: $\rho\text{H}=9,44$, $\lambda_{\text{max}}=433$ нм, $V_{\text{буф. р-ра}}=4,0$ мл, $V_{\text{АЛЗ}}=5,0$ мл, $t=50$ °С;
- оптимальные условия комплексообразования розувастатина с бромкрезоловым зеленым: $\rho\text{H}=3,35$, $\lambda_{\text{max}}=610$ нм, $V_{\text{буф. р-ра}}=5,0$ мл, $V_{\text{БКЗ}}=5,0$ мл, $t=25$ °С.
- 4. Разработанные спектрофотометрические методики апробированы на лекарственном препарате

Эквимер®. Результаты проведенного исследования показали, что относительная ошибка определения менее 5,0%.

Литература

1. Бабко А.К., Пилипенко А.Т. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура. — М.: Химия, 1968. — 389 с.
2. Бернштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. — Л.: Химия, 1986. — 116 с.
3. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. — Л.: Химия, 1986. — 432 с.
4. Вальтер М.Б., Тютенков О.Л., Филиппин Н.А. Постадийный контроль в производстве таблеток. — М.: Медицина, 1982. — 208 с.
5. Грацианский Н.А. Амлодипин и его дженерики в лечении больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Кардиология. — 2007. — № 2. — С. 8–23.
6. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. и др. Основы аналитической химии. Методы химического анализа: Учеб. для вузов / Под ред. Ю.А. Золотова. 3-е изд., перераб. и дополн. — М.: Высш. шк., 2004. — 503 с.
7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. — М.: Химия, 1979. — 480 с.
8. Савенков М.П. Пути повышения эффективности лечения больных артериальной гипертензией // Consilium Medicum. — 2005. — № 7(5). — С. 3–6.
9. Тананаев Н.А. Теоретические основы аналитической химии. Ч. I. — Св.: УПИ, 1958. — 170 с.
10. Arayne M.S., Sultana N., Mirza A.Z., Shamshad H. High performance liquid chromatographic analysis of pioglitazone, gliquidone, rosuvastatin and simvastatin in formulations and human serum // Chin. J. Chem. — 2010. — Vol. 28. — P. 1998–2002.
11. Beasley Ch.A., Shaw J., Zhao Z., Reed R.A. Development and validation of a stability indicating HPLC method for determination of lisinopril, lisinopril degradation product and parabens in the lisinopril extemporaneous formulation // J. of Pharm. and Biomed. Analysis. — 2005. — Vol. 37. — No. 3. — P. 559–567.
12. Bouabdallah S., Trabelsi H., Bouzouita K., Sabbah S. Reversed-phase liquid chromatography of lisinopril conformers // J. of Pharm. and Biomed. Analysis. — 2002. — Vol. 54(1–3). — P. 391–405.
13. Chaudhari B.G., Patel N.M., Shah P.B. Determination of simvastatin, pravastatin sodium and rosuvastatin calcium in tablet dosage forms by HPTLC // Indian J. Pharma Sci. — 2007. — Vol. 69. — P. 130–132.
14. El-Gindy A., Ashour A., Abdel-Fattah L., Shabana M.M. Spectrophotometric and HPTLC-densitometric determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in binary mixtures // J. of Pharm. and Biomed. Analysis. — 2001. — Vol. 25. — No. 5–6. — P. 923–931.
15. Lan K., Jiang X., Li Y., Wang L., Zhou J., Jiang Q., Ye L. Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by ion pair liquid-liquid extraction using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2007. — Vol. 44(2). — P. 540–546.
16. Omboni S., Fogari R., Palatini P. et al. Reproducibility and clinical value of the trough-to-peak ratio of the antihypertensive effect evidence from the sample study // Hypertension. — 1998. — Vol. 32(3). — P. 424–429.
17. Tsakalof A., Bairachtari K., Georgarakis M. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for monitoring the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in serum // J. of Chromatogr. B. — 2003. — Vol. 783. — No. 2. — P. 425–432.

JOINT SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF AMLODIPINE, ROSUVASTATIN AND LYZINOPRYL IN THE MEDICINAL PREPARATION

T.S. KYROVA, Yu.B. IVANTSOV

Perm State National Research University, Russia, Perm

This paper is devoted to the development of joint spectrophotometric determination of amlodipine, rosuvastatin and lisinopril in a combined drug preparation. The development of a spectrophotometric technique is an alternative to HPLC for the determination of active components, which is based on the use of expensive and difficult to handle equipment. Separation of the active ingredients of the combined preparation is possible due to their different solubilities in 0.1 M HCl solution, chloroform, water and the use of organic dyes, which selectively react with amlodipine, rosuvastatin and lisinopril. The determination of amlodipine is based on a reaction with bromocresol purple to form a lemon-yellow product. Lisinopril selectively reacts with alizarin to form a yellow-orange compound. The definition of rosuvastatin is based on the interaction with bromocresol green with the formation of a blue-blue product. To determine each active component of the preparation with organic reagents, optimal conditions for complexation were found: the wavelength of maximum light absorption, the acidity of the solution. The influence of the temperature factor and the excess of the photometric reagent was studied. Graduation graphs were constructed under optimal conditions, molar light absorption coefficients were calculated. The developed techniques have been successfully applied to the analysis of Equamer © medicinal product containing amlodipine, lisinopril and rosuvastatin.

Keywords: amlodipine, lisinopril, rosuvastatin, multi-drug.

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ микроРНК-21

Б. СЕЛЛАМИ^{1*}, И.Ю. САБУРОВА², Д.О. ВИНОХОДОВ¹,
А.Ф. ГУРЧИН³, Р.Ю. СЕЛИВЕРСТОВ³

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,

³ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург

Исследование посвящено поиску новых биомаркеров злокачественных новообразований головного мозга. Проведен дизайн праймеров, построенных по Stem-Loop-технологии, для количественного определения микроРНК-21 в организме человека методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Осуществлен синтез этих праймеров и показана их высокая эффективность при выявлении микроРНК-21. Исследованы значения уровней экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови пациентов с наличием глиомы в стадии прогрессирования, у пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов и у практически здоровых волонтеров. Обнаружено статистически достоверное превышение уровней экспрессии исследуемого гена микроРНК-21 у пациентов с глиомой по сравнению со здоровыми волонтерами и пациентами с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов. На основе полученных данных предложен метод диагностики глиом по уровню экспрессии микроРНК-21.

Ключевые слова: молекулярная диагностика, микроРНК-21, профилирование экспрессии генов, полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), глиома.

Введение

МикроРНК — это некодирующие молекулы РНК длиной около 20 нуклеотидов, которые участвуют в процессе регуляции экспрессии генов на транскрипционном и посттрансляционном уровнях. В последние годы изучению этих молекул отводится особая роль, так как они являются потенциальным решением проблем диагностики, прогнозирования и лечения злокачественных новообразований [3].

Глиальные опухоли составляют большую часть первичных опухолей центральной нервной системы и включают в себя целый спектр опухолей различных по уровню клеточной дифференциации и злокачественности [2]. Все злокачественные глиальные опухоли характеризуются выраженной способностью к инвазии в тканях головного мозга, отсутствием четких границ распространения опухоли и способностью к продолженному росту после хирургического удаления [1].

В злокачественных глиомах выявлено несколько аномально экспрессирующихся микроРНК. В частности, для первичных глиобластом характерна гиперэкспрессия микроРНК-221, в то время как уровень микроРНК-128, микроРНК-181a, микроРНК-181b и микроРНК-181c — микроРНК, активно экспрессирующихся в нормальных тканях мозга, — существенно снижен [6]. Уровень микроРНК-124 и микроРНК-137 снижен не только в первичных глиобlastомах, но и в анапластических астроцитомах, что, по всей видимости, указывает на их онкосупрессорную роль в опухолях данного типа [6].

Считается, что функционально эти микроРНК ингибируют клеточную пролиферацию в глиобlastомах. Экспрессия микроРНК-124 снижена также в медуллобластомах, при этом искусственное увеличение количества этих микроРНК в клеточных линиях приводило к снижению экспрессии онкогена CDK6 и замедлению пролиферации [8].

МикроРНК-21 имеет антиапоптотическую и проинвазивную функции в биологии глиом. Данная микроРНК обладает мощным стимулирующим действием, способствуя росту и пролиферации опухолевых клеток глиом через ингибирование экспрессии опухолевого супрессора PTEN, что приводит к активации Akt-зависимых сигнальных путей, связанных с усиленным синтезом проонкогенных рецепторов EGFR, IGFR и VEGFR [4, 9].

© 2019 г. Селлами Б., Сабурова И.Ю., Виноходов Д.О., Гурчин А.Ф., Селиверстов Р.Ю.

* **Автор для переписки:**

Селлами Бадри

аспирант Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)

E-mail: badsellami@gmail.com

Кроме того, возможно, микроРНК-21 регулирует гены, вовлеченные в процессы миграции клеток. Уровень микроРНК-21 существенно выше в глиобластомах и клеточных линиях глиобластом по сравнению с нормальными клетками мозга. В ряде работ показано, что ингибирование микроРНК-21 в клеточных линиях глиобластом вызывает активацию каспаз и, как следствие, индукцию апоптоза [5, 10].

Таким образом, исследование профилей экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови больных глиомой может позволить найти биологические маркеры, связанные с индукцией или супрессией апоптоза опухолевых клеток, которые могут быть использованы в ранней диагностике глиом.

Материалы и методы

В работе были использованы 24 образца периферической крови, стабилизированной ЭДТА, полученные от пациентов с глиомами различной степени злокачественности в стадии прогрессии заболевания, 24 образца крови от пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов и 24 образца, полученные от практиче-

ски здоровых волонтеров. Все пациенты находились под наблюдением в Институте мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН.

Тотальную РНК выделяли из плазмы крови с использованием реагента TriReagent (MRC, США), согласно стандартной методике производителя. Осадок РНК растворяли в 12 мкл РНК-элюента (Интерлаб-сервис, Москва).

Комплементарную ДНК (кДНК) получали на основе технологии «StemLoop» с использованием набора для обратной транскрипции «ОТ-1» (Синтол, Москва). Реакцию проводили отдельно с праймерами для гена микроРНК-21 и референтного гена U6 (малая ядерная РНК). Реакционная смесь содержала по 5 мкл реакционного буфера (2,5×Реакционная смесь), 10 пМоль специфического праймера для обратной транскрипции (табл. 1), 0,5 мкл ингибитора РНКаз, 0,5 мкл фермента MMLV (Синтол, Москва) и 5 мкл раствора РНК. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-Лайт (ДНК-Технологии, Москва) по следующей программе: 16 °С – 30 мин, 42 °С – 30 мин, 85 °С – 5 мин с последующим охлаждением смеси до 4 °С.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров (Xu et al., 2014) [9]

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
Праймеры для обратной транскрипции	
Hsa-miR-21-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatcagactcaac
U6-RT	gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatcga-caaaaatag
Амплификационные праймеры	
Hsa-miR-21-F	Gcccgtagcttatcagactgatg
U6-F	Gcgcgtcgtgaagcgttc
miR-Comm-R	Gtgagggtccgagg

Исследование экспрессии гена микроРНК-21 проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием набора «2,5×Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя Eva Green» (Синтол, Москва) в конечном объеме 25 мкл. Смесь для ПЦР содержала: 10 мкл 2,5×ПЦР буфера Б (с SynTaq ДНК-полимеразой), по 10 пМолей прямого и обратного праймеров (см. табл. 1) и 5 мкл соответствующего образца кДНК. Амплификация проводилась на приборе ДТ-Lite (ДНК-Технологии, Москва) с учетом уровня флуоресценции по каналу FAM (470/525 нм). Программа амплификации была следующая: 95 °С – 5 мин, затем 45 циклов (95 °С – 15 сек и 60 °С – 1 минута).

Оценка уровня экспрессии микроРНК-21 количественным методом основывалась на его сравнении с экспрессией гена малой ядерной РНК (мяРНК)

U6, используемого в качестве контроля благодаря стабильности уровня его экспрессии. Интенсивность сигнала выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ). Для каждого образца были построены две кривые накопления флуоресцентного сигнала микроРНК-21 и мяРНК U6.

Результатом ПЦР является значение Ct (пороговый цикл) – число необходимых для пересечения флуоресцентным сигналом порога (фоновый уровень). Уровень Ct обратно пропорционален количеству целевой нуклеиновой кислоты в образце (чем ниже уровень Ct, тем выше количество нуклеиновой кислоты-мишени в образце).

Оценка относительного уровня экспрессии гена микроРНК-21 проводилась по протоколу $\Delta\Delta Ct$ и рассчитывалась по формуле $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, где А – Ct гена микроРНК-21, а В – Ct гена U6 [7].

Результаты и обсуждение

Результаты экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови больных глиомой, неонкологическими заболеваниями и волонтеров представлены в таблицах 2, 3 и 4 соответственно. Достоверность различий уровней экспрессии в трех этих группах оценивали при помощи непараметрического статистического U-критерия Манна – Уитни. Все вычисления были выполнены с помощью программы Excel 2013 (Microsoft Corp., Сиэтл, США). Наблюдается статистически достоверное различие трех выборок ($p < 0,05$).

10	32,4	33,0	0,6	0,66
11	34,8	35,6	0,8	0,57
12	38,4	38,0	-0,4	1,32
13	35,6	34,9	-0,7	1,62
14	29,4	29,3	-0,1	1,07
15	32,7	33,0	0,3	0,81
16	34,7	33,9	-0,8	1,74
17	32,8	32,1	-0,7	1,62
18	34,2	33,8	-0,4	1,32
19	31,9	32,0	0,1	0,93
20	35,7	35,1	-0,6	1,52
21	32,6	32,2	-0,4	1,32
22	35,6	32,8	-2,8	6,96
23	35,3	34,7	-0,6	1,52
24	35,5	34,9	-0,6	1,52

Примечание: среднее значение: 1,75

Таблица 4

Уровни экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови у практически здоровых волонтеров

№	Плазма			
	St(U6)	St(микроРНК-21)	ΔSt	$2^{-\Delta Ct}$
1	30,6	30,8	0,2	0,87
2	31,1	33,1	2,0	0,25
3	30,4	30,6	0,2	0,87
4	31,0	30,9	-0,1	1,07
5	30,7	31,2	0,5	0,71
6	30,0	31,0	1,0	0,50
7	30,6	30,6	0,0	1,00
8	30,3	30,6	0,3	0,81
9	30,1	31,2	1,1	0,47
10	30,5	30,2	-0,3	1,23
11	30,3	30,1	-0,2	1,15
12	30,6	31,1	0,5	0,71
13	31,4	31,1	-0,3	1,23
14	30,5	31,3	0,8	0,57
15	30,1	30,4	0,3	0,81
16	30,3	30,1	-0,2	1,15
17	30,1	30,8	0,7	0,62
18	32,2	32,6	0,4	0,76
19	30,2	30,5	0,3	0,81
20	30,8	30,0	-0,8	1,74
21	30,1	30,4	0,3	0,81
22	30,0	30,5	0,5	0,71
23	30,2	30,1	-0,1	1,07
24	30,3	30,2	-0,1	1,07

Примечание: среднее значение: 0,87

Известно, что избыточная экспрессия гена, ответственного за синтез микроРНК-21, едва ли не самый частый признак в процессе развития глиобластом [10]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о повышении уровней экспрессии этой микроРНК у больных с прогрессирующей стадией глиомы по сравнению со здоровыми волонтерами в 72 раза (см. табл. 2, 3 и 4) и пациентами с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов – в 36 раз. При этом отмечается значительная индивидуальная изменчивость этого признака, что, на наш взгляд, накладывает ограничения на применение биомаркера в клинической диагностике. Для создания полноценной системы диагностики мы ведем работу и с

Таблица 2

Уровни экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови пациентов с глиомами различной степени злокачественности в стадии прогрессии заболевания

№	Плазма			
	St(U6)	St(микроРНК-21)	ΔSt	$2^{-\Delta Ct}$
1	31,4	27,3	-4,1	17,15
2	36,2	30,0	-6,2	73,52
3	36,3	29,5	-6,8	111,43
4	30,5	26,9	-3,6	12,13
5	31,5	27,6	-3,9	14,93
6	31,8	25,2	-6,6	97,01
7	32,4	26,7	-5,7	51,98
8	36,3	27,9	-8,4	337,79
9	33,6	28,9	-4,7	25,99
10	36,5	29,1	-7,4	168,90
11	37,5	29,4	-8,1	274,37
12	35,5	31,2	-4,3	19,70
13	34,3	28,1	-6,2	73,52
14	30,5	25,5	-5,0	32,00
15	34,1	28,7	-5,4	42,22
16	33,8	30,2	-3,6	12,13
17	34,0	29,4	-4,6	24,25
18	35,8	31,2	-4,6	24,25
19	34,1	30,0	-4,1	17,15
20	34,7	30,3	-4,4	21,11
21	34,1	30,4	-3,7	13,00
22	34,2	30,8	-3,4	10,56
23	35,2	31,2	-4,0	16,00
24	34,2	29,4	-4,8	27,86

Примечание: среднее значение: 63,29

Таблица 3

Уровни экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови пациентов с воспалительными заболеваниями ЛОР-органов

№	Плазма			
	St(U6)	St(микроРНК-21)	ΔSt	$2^{-\Delta Ct}$
1	31,3	30,2	-1,1	2,14
2	33,1	33,0	-0,1	1,07
3	34,7	33,8	-0,9	1,87
4	37,4	35,4	-2,0	4,00
5	35,5	37,4	1,9	0,27
6	37,4	38,1	0,7	0,62
7	29,3	30,2	0,9	0,54
8	30,2	27,9	-2,3	4,92
9	32,5	31,3	-1,2	2,30

другими биомаркерами. Планируется существенно увеличить размер выборок, а также оценить влияние стадии заболевания на уровень экспрессии микроРНК-21 и других биомаркеров. Также предстоит валидизировать полученную систему в ходе проспективных исследований.

Заключение

Таким образом, предложенный метод диагностики глиомы на основе профилирования экспрессии микроРНК-21 может иметь перспективы для использования в скрининговых исследованиях с целью выявления глиом на ранних стадиях.

Литература

1. Коновалов А.Н., Потапов А.А., Лошаков В.А. и др. Стандарты, рекомендации и опции в лечении глиальных опухолей головного мозга у взрослых // Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. — 2006. — Т. 2. — С. 3–11.
2. Мацко Д.Е., Коршунов А.Г. Атлас опухолей центральной нервной системы. — СПб.: РНХИ им. проф. А.Л. Поленова, 1998. — 197 с.
3. Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. — 2004. — Vol. 431. — P. 350–355.
4. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // Cancer Researches. — 2005. — Vol. 65. — P. 6029–6033.
5. Corsten M.F., Miranda R., Kasmieh R., Krichevsky A.M., Weissleder R., Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas // Cancer Research. — 2007. — Vol. 67(19). — P. 8994–9000.
6. Karsy M., Arslan E., Moy F. Current progress on understanding microRNAs in glioblastoma multiforme // Genes Cancer. — 2012. — Vol. 3. — P. 3–15.
7. Rao X, et al. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // Biostat. Bioinforma. Biomath. — 2013. — Vol. 3(3). — P. 71–85.
8. Slaby O., Lakomy R., Fadrus P., Hrstka R., Kren L., Lzicarova E., Smrcka M., Svoboda M., Dolezalova H., Novakova J., Valik D., Vyzula R., Michalek J. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients // Neoplasma. — 2010. — Vol. 57. — P. 264–269.
9. Xu L.F., Wu Z.P., Chen Y., Zhu Q.S., Hamidi S., Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Ge-jiu City, China // PLoS One. — 2014. — Vol. 9. — e103698.
10. Zhou X., Ren Y., Moore L., Mei M., You Y., Xu P., Wang B., Wang G., Jia Z., Pu P., Zhang W., Kang C. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status // Laboratory Investigations. — 2010. — Vol. 90. — P. 144–155.

GLIOMA DIAGNOSTIC METHOD AT microRNA-21 EXPRESSION LEVEL

B. SELLAMI¹, I.Yu. SABUROVA², D.O. VINOKHODOV¹, A.F. GURCHIN³, R.Yu. SELIVERSTOV³

¹St-Petersburg State Institute of Technology (Technical University),

²Pavlov First St Petersburg State Medical University,

³N.P. Bekhtereva Institute of Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St-Petersburg

The investigation is devoted to the search for new biomarkers of malignant tumors of the brain. The design of primers constructed by stem-loop-technology for the quantitative determination of microRNA-21 in the human body by the method of real-time polymerase chain reaction (PCR-RV) was carried out. The synthesis of these primers has been carried out and their high efficiency has been shown in identifying microRNA-21. The values of microRNA-21 gene expression levels in plasma of patients with gliomas in the progression stage, patients with inflammatory diseases of ENT organs and practically health volunteers were studied. A statistically significant excess of the expression levels of the investigated gene microRNA-21 in patients with glioma was found in comparison with healthy volunteers and patients with inflammatory diseases of ENT organs. On the basis of the data suggested the development of method for diagnosing gliomas by the level of expression of microRNA-21.

Keywords: molecular diagnostics, microRNA, miR-21 gene expression profiling, polymerase chain reaction in real time (RT-PCR), glioma.

ИММУНОДЕТЕКЦИЯ И РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA* С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ *АОХ1а*. ЭКСПЕРИМЕНТ С ВОЗДЕЙСТВИЕМ УФ-В

Е.В. ГАРМАШ*, К.В. ЕРМОЛИНА, М.В. КЫРНЫШЕВА

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар

В работе с использованием метода Вестерн-блоттинга исследовано содержание белка альтернативной оксидазы (АОХ) и его редокс-состояния в экстракте, полученном из листьев *Arabidopsis thaliana* с разным уровнем экспрессии *АОХ1а*, а также изучено влияние повышенной УФ-В радиации на синтез форм АОХ. Выявлены димерная форма АОХ (70 кДа) и две мономерные формы АОХ1 (34 и 30 кДа). Содержание АОХ1 34 кДа коррелировало с уровнем экспрессии *АОХ1а*. Синтез АОХ1 30 кДа индуцировался только при воздействии УФ-В. Редокс-состояние общей фракции белка АОХ зависело от уровня экспрессии *АОХ1а*, при воздействии УФ-В белок находился преимущественно в восстановленной форме.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, альтернативная оксидаза, белок, Вестерн-блоттинг, УФ-В радиация.

Введение

Дыхательная цепь растений, в отличие от животных, содержит два пути транспорта электронов — основной цитохромный (ЦП) и альтернативный (АП). ЦП является главным источником АТФ — энергии, необходимой для всех процессов жизнедеятельности. Электронный транспорт по АП через альтернативную терминальную оксидазу (АОХ) не связан с двумя участками генерации мембранного потенциала, поэтому энергетически мало эффективен. Альтернативный путь дыхания играет важную роль в адаптации к изменяющимся условиям среды, непосредственно участвуя в поддержании окислительно-восстановительного баланса мЭТЦ и предотвращая образование супероксидадикала (Millenaar, Lambers, 2003) [11]. Поэтому АОХ назван «белком выживания» растений («survival protein») (Vanlerberghe et al., 2009) [20] и предложен в качестве маркера клеточного перепрограммирования при стрессе (Arnholdt-Schmitt et al., 2006) [3].

Альтернативная оксидаза (АОХ; ЕС. 1.10.3) — убихинол: кислород-оксидоредуктаза — межфазовый белок-гомодимер. АОХ относится к группе дивалентных

карбоксилатных белков, в которых лиганды связаны с активным центром (железом) карбоксильными группами. Белок связан с одним слоем внутренней митохондриальной мембраны со стороны матрикса межфазовым способом через большую гидрофобную область, сформированную спиралью (Albury et al., 2009) [2]. Масса мономера АОХ варьирует от 32 до 38 кДа, димера — около 70–72 кДа (Грабельных и др., 2014 [1]; Garmash et al., 2017 [8]; Selinski et al., 2018 [14]). Домены N-терминала мономеров АОХ большинства растений связаны между собой ковалентно дисульфидным мостиком остатков цистеина и ответственны за формирование димерной структуры белка АОХ (Albury et al., 2009) [2]. Восстановление дисульфидной связи в сульфгидрильную, приводящее к активации АОХ, регулирует система тиоредоксина (Trx) митохондрий в зависимости от редокс-состояния НАД(Ф)Н пула. Активность восстановленной формы АОХ *in vitro* повышается в условиях высокой восстановленности пула убихинона, а также в присутствии α -кетокислот (в основном, пирувата). Механизмы активации АОХ *in vivo* остаются предметом исследований. Считается, что АОХ *in vivo* находится преимущественно в восстановленном состоянии, а активация белка определяется теми же механизмами, функционирующими *in vitro* (Del-Saz et al., 2017) [7].

В связи с митохондриальной локализацией АОХ идентификацию и определение количества этого белка методом Вестерн-блоттинга чаще проводят во фракции суммарного белка изолированных из тканей митохондрий (Грабельных и др., 2014 [1]; Garmash et al., 2015; Kerbler

© 2019 г. Гармаш Е.В., Ермолина К.В., Кырнышева М.В.

* **Автор для переписки:**

Гармаш Елена Владимировна,
канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений Института биологии Коми научного центра УрО РАН
E-mail: garmash@ib.komisc.ru

et al., 2019 [10]; Sánchez-Guerrero et al., 2019 [13]). Для полного восстановления белка АОХ применяют различные восстанавливающие агенты для образования и/или поддержания восстановленной формы АОХ (ди-тиотрейтол, N-Этилмалеимид) (Грабельных и др., 2014 [1]; Garmash et al., 2017 [8]; Sánchez-Guerrero et al., 2019 [13] и др.). В современных условиях при проведении иммуноферментного анализа используют первичные антитела, распознающие консервативные участки всех изоформ АОХ большинства растений.

Arabidopsis thaliana — известное модельное растение, геном которого стал первым секвенированным геномом растения («The Arabidopsis Genome Initiative», 2000). Геном *A. thaliana* содержит 4 гена *АОХ1(a-d)* и один *АОХ2* (Saisho et al., 1997 [12]; Clifton et al., 2005 [5]). В одних работах показано, что белки АОХ, кодируемые генами *АОХ1*, имеют почти одинаковые массы (31–33 кДа); поэтому их сложно разделить на SDS-ПААГ (Selinski et al., 2018) [14]. Другими авторами четко выявлено, что белок АОХ1А в листьях *A. thaliana* имеет массу 34 кДа (Umbach et al., 2005 [18]; Kerbler et al., 2019 [10]), а при оптимальном разрешении геля и условиях проведения SDS-PAGE-электрофореза возможна идентификация других форм/изоформ *АОХ1* (Kerbler et al., 2019) [10]. Белок АОХ2 (38 кДа), как правило, не проявляется на иммуноблоте, что связано с низкой экспрессией кодирующего его гена (*АОХ2*) в вегетативных органах (Selinski et al., 2018) [14].

Наиболее яркую экспрессию в ответ на различные виды стресса проявляет ген *АОХ1a* (Umbach et al., 2005 [18]; Clifton et al., 2006 [6]; Yoshida et al., 2011 [21]). В некоторых работах показано, что при стрессе нокаутные по *АОХ1a* растения могут вызывать компенсационный эффект, индуцируя экспрессию других форм АОХ (Yoshida et al., 2011 [21]; Sánchez-Guerrero et al., 2019 [13]) и, в частности, *АОХ1D* (Strodtkötter et al., 2009) [15].

Одним из самых сильных факторов окружающей среды является УФ радиация. УФ излучение в составе солнечного света, достигающее поверхности Земли, состоит из УФ-А (315–400 нм) и небольшой части УФ-В волн (280–315 нм). Высокие дозы и длительное воздействие, особенно более коротковолновой УФ-В радиации, оказывает негативный эффект на все живые организмы, в том числе растения. Растения реагируют на высокие дозы УФ-В радиации индукцией защитных механизмов (Tilbrook et al., 2013) [17]. Сведения об индукции синтеза АОХ при адаптации растений к УФ-В облучению ограничены представлениями об

увеличении накопления неизвестной изоформы белка АОХ в листьях *Phaseolus vulgaris* и *Hordeum vulgare* под воздействием фактора (Zhao et al., 2007 [23]; Zhao et al., 2015 [22]).

Цель работы — провести с использованием метода Вестерн-блоттинга идентификацию белка АОХ и его редокс-состояния в тканях листа *A. thaliana* с разным уровнем экспрессии *АОХ1a*, изучить влияние повышенной УФ-В радиации на синтез форм АОХ.

Материалы и методы

В работе использовали три линии арабидопсиса (*A. thaliana* L. [Heynh]): Col-0 (растения дикого экотипа Columbia-0, Col-0), линию XX-2 со сверхэкспрессией *АОХ1a* (растения, трансформированные конструкцией, экспрессирующей дополнительные копии *АОХ1a* в сенсоровой ориентации под контролем промотора CaMV35S), линии AS-12 (растения, трансформированные конструкцией, экспрессирующей *АОХ1a* в антисенсоровой ориентации под контролем промотора CaMV35S) (NASC, Великобритания) (Umbach et al., 2005) [18]. В экспериментах часть 4-недельных растений (стадия роста 1.14; Boyes et al., 2001), выращиваемых в почвенной культуре (условия роста: интенсивность освещения — 100 мкмоль/м² с, фотопериод — 10 ч, температура — 23 °С, влажность — 60%), экспонировали к УФ-В облучению (ЛЭР 40-М, ООО «НИИИС имени А.Н. Лодыгина», Саранск, Россия) в суточной дозе 0,6 кДж/м² (0,2 Вт/м² за один час) в течение 7 дней. Интенсивность потока УФ-В излучения измеряли с помощью радиометра «ТКА-ПКМ» (ООО НТП «ТКА», СПб, Россия). Доза УФ-В 0,6 кДж/м² соответствовала половине уровня УФ-В радиации, получаемой растениями в ясный солнечный день.

Для проведения Вестерн-блоттинга растительный материал (листья) быстро растирали в жидком N₂ и гомогенизировали в 0,1 М Tris-HCl, pH 6,8, содержащем 0,1% (v/v) β-меркаптоэтанола и 1 мМ РМФС. После центрифугирования (20000 g, 20 мин, 4 °С) супернатант инкубировали 30 мин в ацетоне при -20 °С и затем центрифугировали (10000 g, 10 мин, 4 °С). Полученный осадок растворяли в буфере образца по Лэммли, содержащем в конечной концентрации 125 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 1 мМ ЭДТА, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) глицерина, 5% (v/v) β-меркаптоэтанола, 0,05% (w/v) бромфенолового синего и инкубировали 5 мин при 97 °С. Для восстановления АОХ осадок растворяли в буфере образца (без β-меркаптоэтанола,

с 4% (w/v) SDS) с добавлением ДДТ в конечной концентрации 100 мМ. После центрифугирования (10000 g, 15 мин) супернатант использовали для SDS-электрофореза в 12,5% ПААГ, проводимого в камере Mini-PROTEANIII Electrophoretic Cell (Bio-Rad, USA). В супернатанте определяли концентрацию белка методом Брэдфорда (Bradford, 1989) [4]. На дорожку вносили порцию белкового экстракта, содержащую 15 мкг белка.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере переноса (25 мМ Tris, 192 мМ глицина, 10% (v/v) метанола, pH 8,3) с использованием Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA) в течение 1,5 ч при 100 В и 4 °С. Блокирование мембраны проводили при комнатной температуре в 2% (w/v) обезжиренном сухом молоке, разбавленном в буфере TBS-T (pH 7,5) (10 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,5% (v/v) Tween®-20). Для иммунодетекции использовали кроличьи поликлональные антитела к АOX1/2 (AS04 054, Agrisera, Швеция). Гибридизацию мембраны с анти-АОХ1/2 в разведении 1:1000 вели в течение ночи при температуре 4 °С. Разбавитель первичных антител — TBS (pH 7,5) без Tween®-20 во избежание желатинирования детергента. После отмывки мембраны в TBS-T (3 раза по 15 мин) ее заливали раствором вторичных антител (разбавитель — TBS-T) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в соотношении 1:20000 (Blotting Grade GAR IgG (H+L) HRP Conjugate, Bio-Rad, США). Затем мембрану отмывали в TBS-T (3 раза по 15 мин) и использовали для последующего окрашивания. В качестве референсного белка использовали порин (voltage-dependent anion channel protein, VDAC1). Разведение анти-VDAC1 — 1:5000 (AS07 212 Agrisera, Швеция). Для обнаружения белка использовали хемилюминесцентный анализ. Для этого на мембрану наносили реагент, содержащий H₂O₂ и люминол (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США). Детекцию белковых полос осуществляли с помощью гель-документирующей системы (ChemIDoc, Bio-Rad, США). Обработку изображения вели с помощью программного обеспечения Quantity One®1-D Analysis Software, Version 4.6.9. (Bio-Rad, USA). Определяли относительную интенсивность окрашивания белковых полос, которую выражали по отношению к содержанию VDAC1.

В работе приведены данные, полученные в трех независимых сериях опытов. На графиках представле-

ны средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Все параметры рассчитаны на единицу сухой массы. Данные проанализированы с помощью ANOVA с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни при уровне значимости $p < 0,05$ (Statistica 6.1 software, StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов были получены иммуноблоты с визуализацией белка АОХ, представленного разными формами. В присутствии восстанавливающего агента ДДТ белок АОХ был представлен только мономерными формами АОХ с массами 30 и 34 кДа (рис. 1 А, Б). Согласно имеющимся данным, 30 и 34 кДа — это две формы белка АOX1 арабидопсиса, в том числе, в указанных трансформантах (Umbach et al., 2005 [18]; Kerbler et al., 2019 [10]). В отсутствие ДДТ иммуноблот выявил несколько форм белка АОХ, как активной мономерной (восстановленной) так и неактивной (окисленной) димерной формы (рис. 1 В, Г). Белок массой около 70 кДа является димером АОХ. Полоса в области около 50 кДа — возможно, продукт деградации димера, однако это вопрос требует специальных исследований.

Абсолютное содержание АОХ 70 кДа было низким и практически не менялось в разных линиях и вариантах. Однако относительное количество АОХ 70 кДа в общей фракции АОХ (димер плюс мономеры) варьировало в зависимости от условий эксперимента. Соотношение димерной и мономерной форм можно интерпретировать как редокс-состояние белка АОХ (Sánchez-Guerrero et al., 2019) [13]. Расчеты (без учета количества фракции белка 50 кДа) показали, что в контрольных условиях относительное содержание димерной формы в общей фракции АОХ в растениях Col-0, XX-2 и AS-12 составляло 65, 30 и 100% соответственно. Это свидетельствовало о том, что в контрольных условиях уровень экспрессии АOX1a определял редокс-состояние общей фракции белка АОХ. В растениях со сверхэкспрессией АOX1a белок содержался преимущественно в восстановленной форме. При воздействии УФ-В относительное содержание АОХ 70 кДа значительно снижалось до 10–15% от общей суммы белка во всех линиях. Соответственно, большая часть АОХ при воздействии УФ-В находилась в листьях всех линий в активной форме, что согласуется с имеющимися в литературе мнением и данными (Millenaar, Lambers, 2003 [11]; Sánchez-Guerrero et al., 2019 [13]).

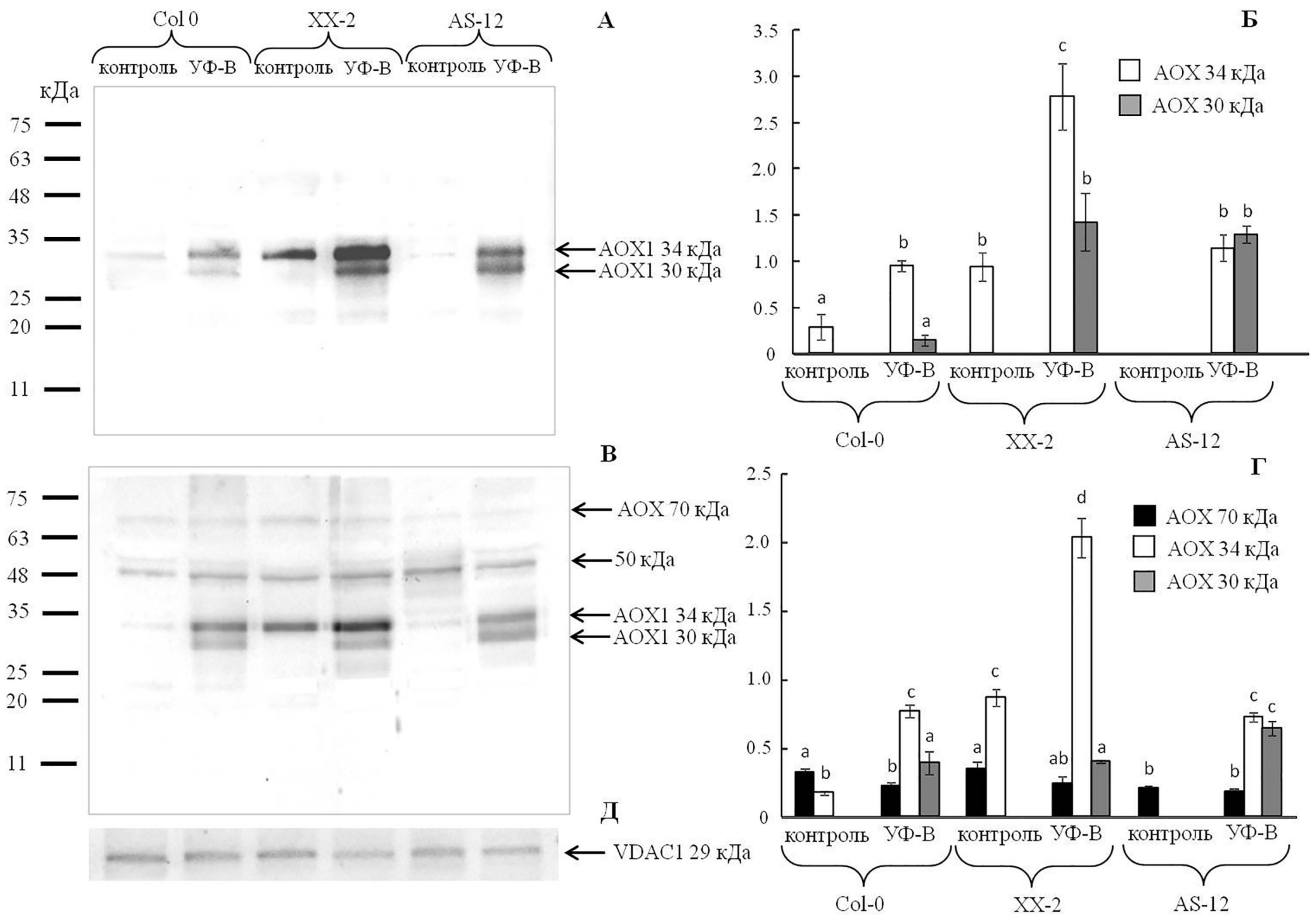


Рис. 1. Иммуноблоты альтернативной оксидазы (АОХ) (А, В) в белковом экстракте, полученном из листьев растений *Arabidopsis thaliana* с разным уровнем экспрессии *АОХ1а*, выращенных в контрольных условиях и при воздействии УФ-В радиации. Col-0 — дикий экотип, XX-2 — линия со сверхэкспрессией *АОХ1а*, AS-12 — антисенсовая по *АОХ1а* линия. А, Б — с предварительной инкубацией белкового экстракта в 100 мМ ДДТ, В, Г — без инкубации с ДДТ. Б, Г — относительное к содержанию VDAC1 (Д) количество белка АОХ

Ни на одном иммуноблоте не детектировали белок АOX2 с массой 38–40 кДа (Selinski et al., 2018) [14]. Это подтверждает данные о специфичной локализации белка АOX2 преимущественно в семенах (Clifton et al., 2005) [5].

Основная фракция белка принадлежала белку АOX1 массой 34 кДа (рис. 1). Растения экотипа Col-0 содержали очень низкое количество АOX1 34 кДа, что согласуется с имеющимися данными о слабом сигнале при иммунодетекции АOX с помощью анти-*АОХ1/2* (AS04 054) в тканевом белковом экстракте листьев арабидопсиса (https://www.agrisera.com/en/artiklar/aox1_2-plant-alternative-oxidase-1-and-2.html). В тканевом экстракте листьев линии AS-12 форма АOX1 34 кДа не обнаружена. Вторую фракцию белка АOX1 с более низкой массой (около 30 кДа) детектировали во всех линиях арабидопсиса только при воздействии УФ-В.

Наиболее высокий уровень синтеза белка АOX1 34 кДа в листьях линии XX-2, особенно при избытке

УФ-В, был явным результатом сверхэкспрессии гена *АОХ1а*. Фракция белка АOX1 30 кДа могла быть продуктом экспрессии нескольких генов — *АОХ1b*, *АОХ1c* и *АОХ1d*, поскольку белки, кодируемые этими генами, имеют более короткую длину полипептидной цепи (318–325 а.о.) по сравнению с АOX1А (354 а.о.) (Saisho et al., 1997 [12]; TAIR, АOX1D: AT1G32350.1).

Индукция синтеза белка АOX1 30 кДа под воздействием УФ-В свидетельствовала о стресс-индуцируемой природе всех белков подсемейства АOX1(A-D) и их потенциальной способности компенсировать друг друга в условиях стресса (Strodtkötter et al., 2009 [15]; Yoshida et al., 2011 [21]). Полагают также, что АOX является не только мишенью, но и регулятором стресс-ответа (Van Aken et al., 2009) [19], а индукция АOX усиливает стресс-сигнал (Juszczuk et al., 2012) [9].

Интересно, что в листьях антисенсовой линии арабидопсиса AS-12, экспонированных к воздействию

УФ-В, белок АОХ был также представлен двумя формами, причем в большем количестве, чем в листьях Col-0. Верхняя фракция 34 кДа была явно продуктом экспрессии АОХ1а. Это вполне вероятно, так как линия AS-12 может содержать до 50% сенсовой последовательности гена (Umbach et al., 2005) [18]. Усиление индукции обеих форм АОХ1 можно расценивать как компенсаторный эффект в ответ на отсутствие АОХ1а в геноме.

Заключение

Проведение Вестерн-блоттинга выявило наличие димерной неактивной и мономерной активной форм белка АОХ в белковом экстракте, полученном из листьев арабидопсиса с разным уровнем экспрессии АОХ1а. Содержание димерной неактивной формы АОХ 70 кДа было относительно низким во всех вариантах. Основная фракция АОХ была представлена восстановленной формой белка АОХ1А с массой 34 кДа. Синтез АОХ1А коррелировал с уровнем экспрессии гена АОХ1а и усиливался при повышенном УФ-В. Вторую фракцию белка АОХ1 с более низкой массой 30 кДа детектировали только при действии УФ-В. Это указывало на стресс-индуцируемую природу всех форм АОХ1. В контрольных условиях редокс-состояние общей фракции белка АОХ зависело от уровня экспрессии АОХ1а, а при воздействии УФ-В белок находился преимущественно в восстановленной форме.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00476 А.

Литература

1. Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л., Побежимова Т.П., Катышев А.И., Павловская Н.С., Королева Н.А., Любушкина И.В., Баймаков В.Ю., Попов В.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. — 2014. — Т. 79. — Вып. 6. — С. 647–662.
2. Albury M.S., Elliott C., Moore A.L. Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants // *Physiol. Plant.* — 2009. — Vol. 137. — P. 316–327.
3. Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H., de Melo D.F. AOX: a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? // *Trends Plant Sci.* — 2006. — Vol. 11. — P. 281–287.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
5. Clifton R., Lister R., Parke K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 58. — P. 193–212.
6. Clifton R., Millar A.H., Whelan J. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — Vol. 1757. — P. 730–741.
7. Del-Saz N.F., Ribas-Carbo M., McDonald A.E., Lambers H., Fernie A.R., Florez-Sarasa I. An in vivo perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway // *Trends Plant Sci.* — 2018. — Vol. 23. — P. 206–219.
8. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Silina E.V., Voinikov V.K., Golovko T.K. Expression profiles of genes for mitochondrial respiratory energy-dissipating systems and antioxidant enzymes in wheat leaves during de-etiolation // *J. Plant Physiol.* — 2017. — Vol. 215. — P. 110–121.
9. Juszczuk I.M., Szal B., Rychter A.M. Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction // *Plant Cell Environ.* — 2012. — Vol. 35. — P. 296–307.
10. Kerbler S.M., Taylor N., Millar A.H. Cold sensitivity of mitochondrial ATP synthase restricts oxidative phosphorylation in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* — 2019. — Vol. 221. — P. 1776–1788.
11. Millenaar F.F., Lambers H. The alternative oxidase: in vivo regulation and function // *Plant Biol.* — 2003. — Vol. 5. — P. 2–15.
12. Saisho D., Nambara E., Naito S., Tsutsumi N., Hirai A., Nakazono M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 35. — P. 585–596.
13. Sánchez-Guerrero A., Del-Saz N.F., Florez-Sarasa I., Ribas-Carbó M., Fernie A.R., Jiménez A., Sevilla F. Coordinated responses of mitochondrial antioxidative enzymes, respiratory pathways and metabolism in *Arabidopsis thaliana* thioredoxin trxo1 mutants under salinity // *Environ. Exp. Bot.* — 2019. — Vol. 162. — P. 212–222.
14. Selinski J., Hartmann A., Deckers-Hebestreit G., Day D.A., Whelan J., Scheibe R. Alternative oxidase isoforms are differentially activated by tricarboxylic acid cycle intermediates // *Plant Physiol.* — 2018. — Vol. 76(2). — P. 1423–1432.
15. Strodtkötter I., Padmasree K., Dinakar C., Speth B., Niazi P.S., Wojtera J., Voss I., Do P.T., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Linkea V., Raghavendra A.S., Scheibe R. Induction of the AOX1D isoform of alternative oxidase in *A. thaliana*

- T-DNA insertion lines lacking isoform AOX1A is insufficient to optimize photosynthesis when treated with antimycin A // *Mol. Plant.* – 2009. – Vol. 2. – P. 284–297.
16. The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // *Nature.* – 2000. – Vol. 408 (6814). – P. 796–815.
17. Tilbrook K., Arongaus A.B., Binkert M., Heijde M., Yin R., Ulm R. The UVR8 UV-B photoreceptor: perception, signaling and response // *The Arabidopsis Book.* – 2013. – Vol. 11. – e0164. doi: 10.1199/tab.0164.
18. Umbach A.L., Fiorani F., Siedow J.N. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 139. – P. 1806–1820.
19. Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J. Alternative oxidase: a target and regulator of stress response // *Physiol. Plant.* – 2009. – Vol. 137(4). – P. 354–361.
20. Vanlerberghe G.C., Cvetkovska M., Wang J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? // *Physiol. Plant.* – 2009. – Vol. 137. – P. 392–406.
21. Yoshida K., Terashima I., Noguchi K. How and why does mitochondrial respiratory chain respond to light? // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – Vol. 6. – P. 864–866.
22. Zhao C., Wang X., Wang X., Wu K., Li P., Chang N., Wang J., Wang F., Li J., Bi Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and alternative oxidase are involved in the cross tolerance of highland barley to salt stress and UV-B radiation // *J. Plant Physiol.* – 2015. – Vol. 181. – P. 83–95.
23. Zhao M.G., Liu Y.G., Zhang L.X., Zheng L., Bi Y.R. Effects of enhanced UV-B radiation on the activity and expression of alternative oxidase in red kidney bean leaves // *J. Integr. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 49. – P. 1320–1326.

IMMUNODETECTION AND REDOX STATE OF ALTERNATIVE OXIDASE IN LEAVES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* PLANTS WITH MODIFIED LEVEL OF AOX1A EXPRESSION. EXPERIMENT WITH UV-B IMPACT

E.V. GARMASH, K.V. ERMOLINA, M.V. KYRNY SHEVA

Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

The levels of alternative oxidase (AOX) protein and AOX redox state in the total protein extracts from leaf tissue of *Arabidopsis thaliana* with modified level of *AOX1a* expression as well as effects of enhanced UV-B radiation on AOX forms synthesis were studied using Western blotting. The dimeric AOX (oxidized, 70 kDa) and two monomeric AOX1 (reduced, 35 and 30 kDa) forms were revealed. The abundance of AOX1 34 kDa was correlated with *AOX1a* expression. The AOX1 30 kDa band appeared in all genotypes under UV-B exposure only. Redox state of AOX depended from *AOX1a* expression; under UV-B exposure AOX was predominantly in reduced form.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, alternative oxidase, protein, Western blotting, UV-B radiation.

ПОДЛЕДНОЕ ЦВЕТЕНИЕ ФИТОПЛАНКТОНА В МОЖАЙСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ

О.Н. ЕРИНА*, В.В. ПУКЛАКОВ, Д.И. СОКОЛОВ, А.В. ГОНЧАРОВ

Географический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Изменения климата существенным образом меняют зимний гидрологический режим водных объектов. Многочисленные оттепели, которыми характеризуется современный зимний период в центральной части Европейской территории России, приводят к значительному (вплоть до полного) стаиванию снежного покрова, что серьезно меняет условия подледной освещенности. В 2016 году ежедневными наблюдениями в период ледостава на Можайском водохранилище была зафиксирована активная вегетация фитопланктона, обусловленная стаиванием снега с ледового покрова водоема. В результате активности водорослей содержание кислорода в подледном слое увеличилось до 220% насыщения. Гидроэкологическое обследование, проведенное по всей длине водоема на пике цветения, показало, что наиболее активное развитие водорослей происходило в центральном районе водохранилища на расстоянии 20–35 км от плотины. При этом 95% биомассы водорослей составляли представители отдела диатомовых рода *Stephanodiscus*. В результате произошло серьезное увеличение содержания органических веществ в водоеме. Учащение подобных явлений может существенно увеличить стоимость водоподготовки на Рублевской и Западной водопроводных станциях.

Ключевые слова: фитопланктон, цветение, водохранилище, зимний режим, растворенный кислород.

Введение

Продукционные процессы в водоемах в период ледостава гораздо менее изучены [19, 20] по сравнению с вегетационным периодом по ряду причин. В зимний период при низких температурах воды скорости протекания химико-биологических реакций существенно замедляются. Кроме этого, наличие ледяного и особенно снежного покрова ограничивает проникновение света в водную толщу и тем самым лимитирует развитие холодолюбивых видов фитопланктона. Проблематика борьбы с цветением в зимний период в водоемах умеренной зоны, характеризующихся устойчивым ледовым покровом в течение нескольких месяцев, не является актуальной для водопользователей. Однако в последние годы в мировой литературе больше внимания стало уделяться зимнему режиму водоемов в связи с глобальными изменениями климата. Сроки установления и разрушения ледостава начали значительно сдвигаться, а зимы — характеризоваться

многочисленными оттепелями [12, 18]. В результате в течение периода ледостава в водохранилище попадает больше питательных веществ, что может становиться стимулом для развития холодолюбивых видов водорослей.

Активное развитие фитопланктона в зимний период приводит к росту продукции органического вещества [14], на утилизацию которого затрачивается дополнительный кислород, что в условиях отсутствия поступления кислорода из атмосферы в сочетании со стратификацией водной толщи в это время способствует ускоренному истощению запасов кислорода в водоемах. Таким образом, подледное цветение водорослей может являться не только индикатором климатических изменений, но и приводит к ухудшению качества воды в водоемах зимой и даже формированию заморных явлений [13]. Поэтому изучение механизмов данного явления и его динамики представляет как научный, так и практический интерес, особенно если водные объекты используются для водоснабжения, потому что водоподготовка в условиях низких температур воды требует использования большего количества реагентов ввиду их низкой растворимости и очистки воды от дополнительного органического вещества автохтонного происхождения.

Материалы и методы

Материалами для данного исследования послужили наблюдения, проводившиеся на Можайском

© 2019 г. Ерина О.Н., Пуклаков В.В., Соколов Д.И., Гончаров А.В.

* **Автор для переписки:**

Ерина Оксана Николаевна
научный сотрудник кафедры гидрологии суши географического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

E-mail: oxana.erina@geogr.msu.ru

водохранилище, расположенном в Московской области и являющимся наиболее крупным из водохранилищ системы водоснабжения г. Москвы. Это эвтрофный водоем долинного типа, в котором ежегодно возникает плотностная стратификация как в летний, так и в зимний периоды, которая способствует истощению запасов кислорода в гипolimнионе в связи с его потреблением на дыхание биоты и деструкцию органического вещества. В зимний

период единственным источником поступления кислорода в водоем служат плотностные течения, которые распространяют речные воды с более высоким содержанием O_2 по водоему, тем самым несколько пополняя его запасы в придонных слоях. Однако к концу периода ледостава содержание растворенного кислорода может опускаться до 2–4 мг/л, формируя таким образом неблагоприятные условия для существования гидробионтов.

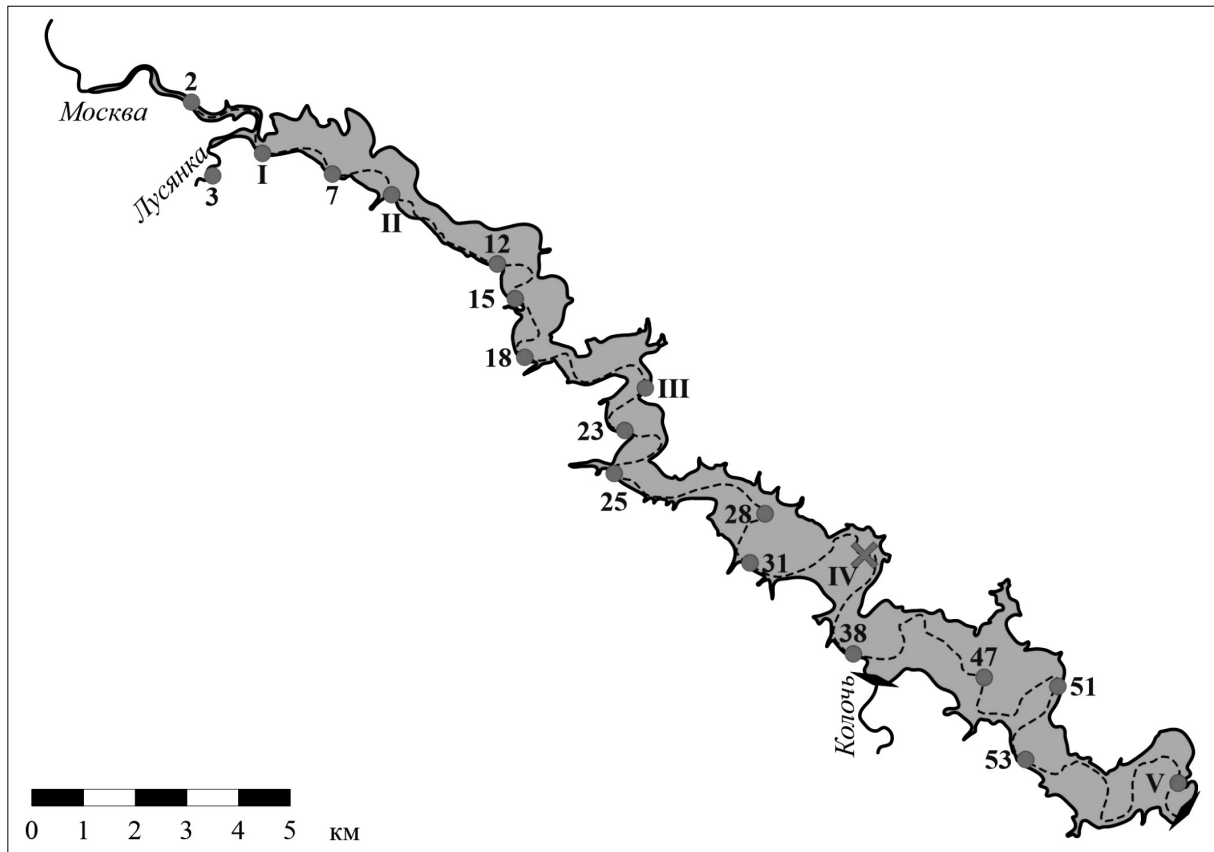


Рис. 1. Схема Можайского водохранилища с расположением станций наблюдений

В период ледостава 2015–2016 гг. сотрудниками Красновидовской учебно-научной базы МГУ имени М.В. Ломоносова проводились ежедневные наблюдения на рейдовой вертикали в центральном районе водохранилища (станция IV) за распределением температуры, электропроводности и растворенного кислорода, а также толщиной снежного и ледяного покрова. В конце зимы, когда содержание растворенного кислорода в подледном слое, по данным этих наблюдений, достигало 150% насыщения, была проведена комплексная съемка всего водохранилища по стандартной сетке из 18 станций, равномерно разнесенных по длине водоема (рис. 1), в ходе которой отбирались пробы воды для определения содержания биогенных элементов, органических веществ и фитопланктона. Всего на разных горизонтах водохранилища было отобрано и обработано 55 проб. Для

оценки абиотических свойств среды на каждой станции проводилось вертикальное зондирование водной толщи: определялись температура воды, удельная электропроводность, содержание растворенного кислорода и pH с помощью термокондуктометра YSI Pro30, оксиметра YSI ProODO и pH-метра YSI Pro10. Для контроля показателей оксиметра параллельно отбирались пробы для определения содержания растворенного кислорода методом Винклера [9]. Концентрации минерального и валового фосфора определялись методом Морфи – Райли в соответствии с РД 52.10.738-2010 и РД 52.10.739-2010 [7, 8], содержание минерального кремния – спектрофотометрическим методом в виде желтой формы молибдокремниевой кислоты [10]. Химическое потребление кислорода (ХПК), косвенно характеризующее общее содержание органических веществ, определяли титри-

метрически [1, 6] арбитражным методом бихроматного окисления в модификации А.П. Остапени [5]. Пробы воды объемом 0,5 л для определения фитопланктона отбирали из подледного слоя с глубины 0,3 м, консервировали формалином, концентрировали фильтрованием через мембранные фильтры (фирмы «Сынпор», с диаметром пор 0,8 мкм). Водоросли подсчитывали под световым микроскопом Микмед-6 в камере Нажотта в количестве около 400 клеток (колоний) всех видов. Биомассу определяли по средним размерам клеток каждого вида в пробе с использованием таблиц В.Г. Кузьмина [2]. Идентификацию водорослей проводили с помощью общепринятых определителей [3].

Результаты и обсуждение

Зимний период 2016 года характеризовался несколькими продолжительными оттепелями, которые привели к существенному истощению снежного покрова. Так, в результате первой крупной оттепели 27 января — 4 февраля 2016 г., среднесуточная температура во время которой достигала 2 °С, высота снежного покрова на снегомерной площадке метеостанции Можайск за неделю уменьшилась с 22 до 8 см (рис. 2). После этого в феврале наблюдалось еще несколько подобных синоптических циклов продолжительностью 3–5 дней, в результате чего минимальная толщина снега достигла 4 см. Обильные осадки в период с 23 февраля по 5 марта обеспечили увеличение высоты снежного покрова до 30 см, однако после этого температура воздуха опять превысила отметку 0 °С и вновь активизировалось таяние снега на водосборе. В результате к началу половодья 29 марта снег на водосборе практически полностью отсутствовал.

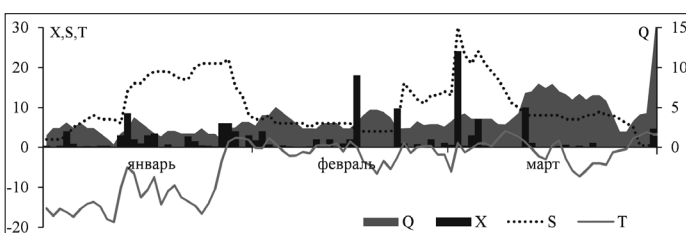


Рис. 2. Колебания расхода воды р. Москвы в створе д. Барсуки Q ($\text{м}^3/\text{с}$); данные метеостанции г. Можайск: суточный слой атмосферных осадков X (мм), высота снежного покрова S (см), среднесуточная температура воздуха T ($^{\circ}\text{C}$) в период ледостава 2016 г.

Что касается самого водохранилища, то, по данным наблюдений, на рейдовой вертикали в центральном районе уже в результате первой оттепели произошло полное стаивание снега (рис. 3), и с 17 февраля содержание

растворенного кислорода в подледном слое в результате фотосинтетической деятельности фитопланктона начинает превышать 100% насыщения. В период до 20 марта содержание кислорода изменялось в незначительном диапазоне, уменьшаясь до 90–95% насыщения после выпадения снега и снижения интенсивности продукционных процессов в результате уменьшения освещенности подледных слоев воды и увеличиваясь до 120% насыщения в периоды отсутствия снега на льду. В последнюю декаду марта начинается интенсивный рост концентрации растворенного кислорода в верхнем двухметровом слое воды. Максимальное пересыщение воды кислородом наблюдалось 28 марта, когда его содержание в подледном слое составило 24,01 мг/л или 167% насыщения. В дальнейшем после начала весеннего половодья, поступления в водохранилище талых речных вод и таяния ледяного покрова водоема содержание кислорода в подледном слое стало резко уменьшаться и к 7 апреля составляло всего 8 мг/л, что соответствовало 55% насыщения. В то же время его концентрация на глубинах 1–2 м по-прежнему превышала 100% насыщения, причем толщина зоны пересыщения воды кислородом постепенно увеличивалась в результате интенсивного перемешивания поверхностных слоев воды под воздействием весенней свободной конвекции, глубина проникновения которой к моменту схода льда достигла 7 м. Таким образом, общая продолжительность периода, в который наблюдалось пересыщение поверхностных слоев воды кислородом составила около 1,5 месяцев, а наиболее активного развития фитопланктона — около 10 дней.

Такие существенные превышения концентрации насыщения воды растворенным кислородом связаны с тем, что в период ледостава для спродуцированного водорослями кислорода отсутствовали возможности его эвазии в атмосферу. При этом интенсивность расходования кислорода на окисление органического вещества, в том числе автохтонного, была крайне низкой из-за температуры воды в подледном слое, близкой к 0 °С.

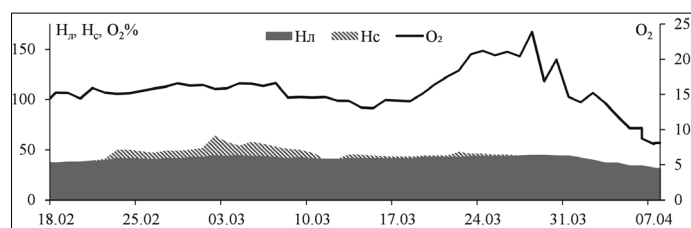


Рис. 3. Динамика толщины снежного и ледяного покрова, а также содержания растворенного кислорода на глубине 1 м на рейдовой вертикали Можайского водохранилища в районе д. Красновидово (ст. IV)

Гидролого-гидрохимическая съемка, проведенная на пике подледной фотосинтетической активности фитопланктона, позволила оценить пространственную неоднородность интенсивности продукционных процессов и обусловленную ими трансформацию химического состава водной толщи водохранилища.

По результатам обследования, было зафиксировано повышенное содержание растворенного кислорода в верхнем трехметровом слое воды в центральном и нижнем районах водохранилища — на всех станциях, расположенных на удалении 35 и менее км от плотины. Максимальные концентрации O_2 в подледном слое достигали 220% насыщения, что соответствовало 31,4 мг/л. Очаг активного развития водорослей, выявленный по максимальным концентрациям растворенного кислорода, располагался на удалении 20–35 км от плотины (рис. 4). В этом районе наблюдалось и повышение величины рН до 9,0–9,2 единиц, тогда как в районах с содержанием кислорода менее 100% насыщения наблюдаемые значения рН не превышали 8,5.

Вегетация фитопланктона повлияла на распределение и других гидрохимических характеристик водоема. Так, в местах наиболее активного фотосинтеза наблюдалось снижение концентраций минерального кремния, потребляемого водорослями. Если в речной водной массе его концентрация составляла 3,5–4,0 мг/л, то на расстоянии 20–35 км от плотины в поверхностных слоях наблюдалось уменьшение содержания кремния до 2–2,5 мг/л.

Распределение содержания валового фосфора (ТР) в водохранилище также хорошо отражает пространственную неоднородность продукционных процессов. В результате роста водорослей общее содержание фосфора в местах их наиболее активного развития превышало 0,2 мг/л, тогда как ниже слоя фотосинтеза оно составляло 0,05–0,1 мг/л. Что касается соотношения минеральной и органической форм, то в местах наиболее высокой активности фитопланктона доля минерального фосфора уменьшалась до 10–35% от общего его содержания, тогда как в речных водах и придонной водной массе она составляла 70–85%.

Таким образом, рассмотрение пространственной неоднородности гидрохимических характеристик водохранилища позволило выявить места наиболее активного фотосинтеза в подледный период, где происходило потребление минеральных веществ и их трансформация в органические в процессе жизнедеятельности фитопланктона.

В результате развития фитопланктона в водохранилище существенно увеличилось содержание органических веществ (ОргВ). Общая концентрация ОргВ (по ХПК) в

зонах с максимальными величинами первичной продукции превышала 20 мг/л и совпадает с зонами максимального насыщения водной толщи растворенным кислородом. Таким образом, подледное цветение фитопланктона спровоцировало дополнительное увеличение автотонной нагрузки органическими веществами на водоем.

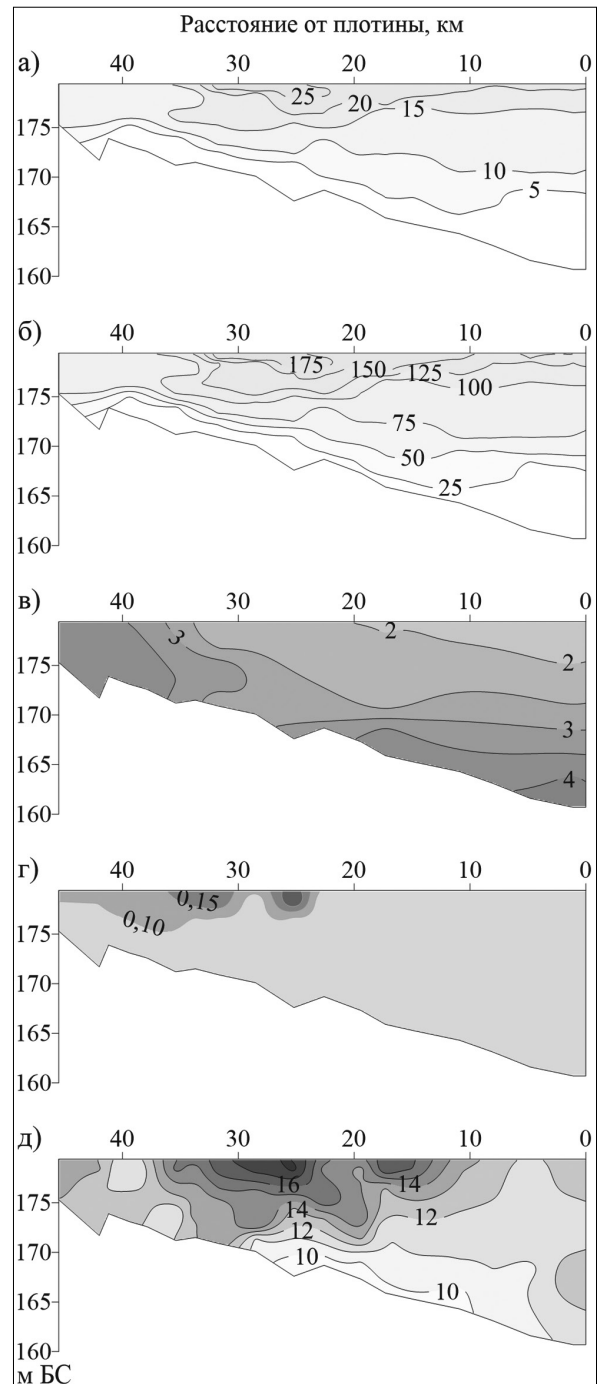


Рис. 4. Распределение растворенного кислорода, мг/л (а) и % насыщения (б), минерального кремния, мг/л (в), валового фосфора, мг/л (г) и химического потребления кислорода (мгО/л) (д) в Можайском водохранилище по результатам гидролого-гидрохимической съемки 2627.03.2016 г.

Анализ фитопланктона в подледном слое воды показал, что его максимальная биомасса наблюдалась в центральном районе на удалении 17–20 км от плотины (станции 28 и IV) и превышала 3 мг/л, а численность водорослей — 15 млн кл/л (рис. 5). Доминирующим видом, формирующим биомассу фитопланктона, являлся *Stephanodiscus sp.* При этом в приплотинном районе (станция V) с аналогичной видовой структурой альгофлоры общая биомасса составляла всего 0,05 мг/л. На станции III, расположенной в 31,7 км от плотины, преобладал отряд зеленых водорослей, однако их общая численность и биомасса здесь невелики — 2,3 млн кл/л и 0,44 мг/л соответственно. При этом содержание кислорода на данной станции достигает 180% насыщения, то есть активность фотосинтеза фитопланктона здесь тоже высока.

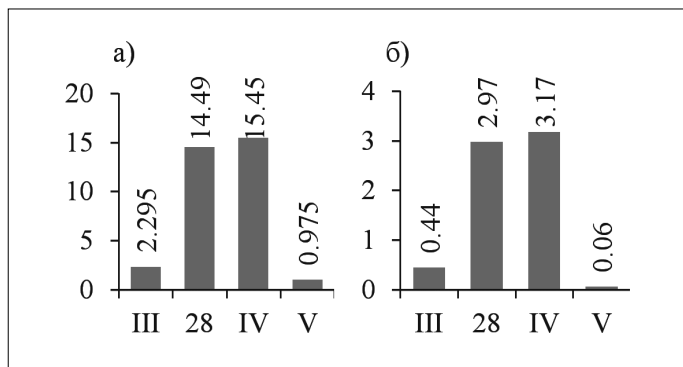


Рис. 5. а) Численность (млн кл/л) и б) биомасса (мг/л) фитопланктона в подледном слое воды в разных районах Можайского водохранилища 30.03.2016 г.

Информация об активном зимнем развитии данного представителя отряда диатомовых и в условиях ледостава, и при его отсутствии встречается как в работах исследователей российских озер [11], так и европейских и азиатских водоемов и водотоков [15–17]. Для Можайского водохранилища, однако, подобные значения биомассы являются весьма необычным явлением, которое могло сформироваться лишь при сочетании комплекса гидрометеорологических факторов, описанных выше. По данным исследований 1970-х гг., в видовом составе зимнего планктона преобладал род *Trachelomonas* отдела эвгленовых [4]. Следовательно, можно говорить о трансформации и видовой структуры зимнего фитопланктона в Можайском водохранилище.

Заключение

В результате регулярных наблюдений на Можайском водохранилище в зимний период удалось зафиксировать уникальное для данного водоема явление

активной вегетации фитопланктона, происходившей во время ледостава в течение полутора месяцев и достигнувшей пика в центральном и приплотинном районах водохранилища в конце марта перед началом половодья.

Ввиду учащения зимних оттепелей в последние годы стаивание снега с ледяного покрова водоемов становится нередким явлением, поэтому можно ожидать более частого возникновения зимнего цветения водорослей в водоемах умеренной зоны.

При этом для водоемов, служащих источниками водоснабжения, учащение повторяемости данного явления в период ледостава может повлечь за собой существенное увеличение затрат при водоподготовке ввиду необходимости очистки от дополнительно произведенного фитопланктоном органического вещества, что серьезно осложняется при низких температурах воды в зимний период.

Анализ влияния гидрометеорологических условий на зимний режим водохранилища выполнен при поддержке проекта РФФИ №1905-00087а. Изучение пространственной неоднородности гидроэкологических характеристик по длине водохранилища выполнено при поддержке гранта РФФИ №18-05-01066а.

Литература

- ГОСТ 31859-2012. Вода. Метод определения химического потребления кислорода. — М.: Стандартинформ, 2013. — 15 с.
- Кузьмин Г.В. Таблицы для вычисления биомассы водорослей. — Магадан, 1984. — 48 с.
- Определитель пресноводных водорослей СССР. — Л.: Наука, 1951–1986.
- Орлеанская О.Б. Зимний фитопланктон Можайского водохранилища // Комплексные исследования водохранилищ. — М.: Изд-во МГУ, — 1978. — Вып.4. — С. 189–191.
- Остапеня А.П. Полнота окисления органического вещества водных беспозвоночных методом бихроматного окисления // Доклады АН БССР. — 1965. — Т.9. — Вып. 4. — С. 273–276.
- ПНД Ф 14.1:2.3.100-97. Методика измерений химического потребления кислорода в пробах природных и сточных вод титриметрическим методом. — М., 2016. — 18 с.
- РД 52.10.738-2010. Массовая концентрация фосфатов в морских водах. Методика измерений фотометрическим методом.
- РД 52.10.739-2010. Массовая концентрация общего фосфора в морских водах. Методика измерений фотометрическим методом после окисления персульфатом калия.

9. РД 52.24.419-2005. Методика выполнения измерений массовой концентрации растворенного кислорода в водах титриметрическим методом.
10. РД 52.24.433-2005. Методика выполнения измерений массовой концентрации кремния в поверхностных водах суши фотометрическим методом в виде желтой формы молибдодокремниевой кислоты.
11. Babanazarova O., Sidelev S., Schischeleva S. The structure of winter phytoplankton in Lake Nero, Russia, a hypertrophic lake dominated by Planktothrix-like Cyanobacteria // *Aquat. Biosyst.* — 2013. — Vol. 9. — P. 18–28.
12. Brown L.C., Duguay C.R. The response and role of ice cover in lake-climate interactions // *Progress in Physical Geography.* — 2010. — Vol. 34. — No. 5. — P. 671–704.
13. Fang X., Stefan H.G. Simulations of climate effects on water temperature, dissolved oxygen, and ice and snow covers in lakes of the contiguous US under past and future climate scenarios // *Limnology and Oceanography.* — 2009. — Vol. 54. — No. 6. — P. 2359–2370.
14. Hodell D.A., Schelske C.L. Production, sedimentation, and isotopic composition of organic matter in Lake Ontario // *Limnology and Oceanography.* — 1998. — Vol. 43. — No. 2. — P. 200214.
15. Jung S.W., Kwon O.Y., Lee J.H., Han M.S. Effects of water temperature and silicate on the winter blooming diatom *Stephanodiscus hantzschii* (*Bacillariophyceae*) growing in eutrophic conditions in the lower Han River, South Korea // *Journal of Freshwater Ecology.* — 2009. — Vol. 24. — No. 2. — P. 219–226.
16. Kiss K.T., Genkal S.I. Winter blooms of centric diatoms in the River Danube and in its side-arms near Budapest (Hungary) // *Hydrobiologia.* — 1993. — Vol. 269. — P. 317–325.
17. Kyong Ha, Min-Ho Jang, Gea-Jae Joo. Winter *Stephanodiscus* bloom development in the Nakdong River regulated by an estuary dam and tributaries // *Hydrobiologia.* — 2003. — Vol. 506. — P. 221–227.
18. Straile D., Jöhnk K., Henno R. Complex effects of winter warming on the physicochemical characteristics of a deep lake // *Limnology and Oceanography.* — 2003. — Vol. 48. — No. 4. — P. 1432–1438.
19. Wiedner C., Nixdorf B. Success of chrysophytes, cryptophytes and dinoflagellates over blue-greens (cyanobacteria) during an extreme winter (1995/96) in eutrophic shallow lakes // *Hydrobiologia.* — 1998. — Vol. 369/370. — P. 229–235.
20. Wojciechowska W., Peczuła W., Żykubek A. Eutrophication and winter-period structure of phytoplankton in three deep lakes in the Leczna-Włodawa Lakeland, Eastern Poland // *Pol. J. Ecol.* — 1998. — Vol. 46. — P. 89–99.

SUBGLACIAL PHYTOPLANKTON BLOOMS IN THE MOZHAISK RESERVOIR

H.E. ERINA, V.V. PUKLAKOV, D.I. SOKOLOV, A.V. GONCHAROV

Faculty of Geography M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Climate changes significantly change the winter hydrological regime of water bodies. The numerous thaws that characterize the modern winter period in the central part of the European territory of Russia lead to a significant (up to complete) melting of the snow cover, which seriously changes the conditions of ice illumination. In 2016, daily observations during the period of freezing on the Mozhaisk Reservoir recorded an active vegetation of phytoplankton due to melting of snow from the ice cover of the reservoir. As a result of algae activity, the oxygen content in the subglacial layer increased to 220% saturation. A hydroecological survey conducted along the entire length of the reservoir at the peak of bloom showed that the most active development of algae occurred in the central region of the reservoir at a distance of 20–35 km from the dam. Moreover, 95% of the algae biomass was made up of representatives of the diatom department of the genus *Stephanodiscus*. As a result, there was a serious increase in the content of organic substances in the reservoir. The increase in such phenomena can significantly increase the cost of water treatment at Rublevskaya and Western waterworks.

Keywords: phytoplankton, bloom, reservoir, winter dynamics, dissolved oxygen.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

А.О. КОЧЕТКОВА*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

В связи с возрастающей ролью псевдотуберкулеза в инфекционной патологии человека лабораторной диагностике этого возбудителя придается большое значение. Бактериофаги применяются для индикации и фаготипирования бактерий, а также ускоренной индикации возбудителей бактериальных инфекций в различных субстратах. Фаготипирование штаммов позволяет составить более полный эпидемиологический анализ заболеваний, вызванных иерсиниями. Поиск и разработка методов современной индикации возбудителя, вызывающего заболевание, являются актуальной задачей, в связи с чем целью настоящего исследования явились выделение фагов из штаммов *Y. pseudotuberculosis* различных О-сероваров и изучение их биологических свойств. Таким образом, с помощью специально подобранных четырех индикаторных штаммов *Y. pseudotuberculosis* удалось обнаружить шесть новых псевдотуберкулезных бактериофагов. Было выявлено также, что изученные фаги обладают антигенной специфичностью, которая позволяет использовать этот признак при их дифференциации и идентификации. Типирующие фаги у *Y. pseudotuberculosis* отсутствуют, поэтому накопление данных о новых псевдотуберкулезных фагах, перспективных для диагностики возбудителя *Y. pseudotuberculosis*, не теряет своей актуальности.

Ключевые слова: псевдотуберкулез, биологические свойства, бактериофаги, фаготипирование.

Введение

Инфекция, вызываемая *Yersinia pseudotuberculosis*, привлекает к себе внимание исследователей в связи с ростом заболеваемости и все более широким ее распространением. Ежегодно в Российской Федерации регистрируют вспышки псевдотуберкулеза, в основном в детских образовательных учреждениях. Анализ изученных факторов патогенности подтверждает абсолютную патогенность бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* для людей и животных. В последние годы отмечается тенденция к росту затяжных, рецидивирующих форм. Многообразие клинических проявлений псевдотуберкулеза затрудняет его диагностику, в результате чего некоторые случаи этой инфекции остаются нераспознанными и скрываются под диагнозами других инфекционных заболеваний [4, 11, 12].

В настоящее время увеличился процент обнаружения иерсиний в объектах внешней среды. К роду *Yersinia* относятся несколько видов микроорганизмов, из которых для человека патогенны *Y. pestis*, *Y.*

pseudotuberculosis, *Y. enterocolitica*. Идентификация и дифференциация инфекций, вызванных этими иерсиниями, связаны с рядом трудностей, обусловленных сочетанностью и сопряженностью очагов, сходством биологических свойств возбудителей [5, 7]. В связи с возрастающей ролью *Y. pseudotuberculosis* в инфекционной патологии человека [3, 8, 9] лабораторной диагностике этого возбудителя придается большое значение.

Для патогенных представителей рода *Yersinia* характерно явление бактериофагии. При схожести многих биологических свойств чумного, псевдотуберкулезного и кишечной иерсиниозного микробов отличительным их признаком является неодинаковая лизабельность гомо- и гетерологичными фагами. Бактериофаги применяются для индикации и фаготипирования бактерий, а также ускоренной индикации возбудителей бактериальных инфекций в различных субстратах. Сейчас широко используется в лабораторной практике коммерческий псевдотуберкулезный бактериофаг, выпускаемый ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Данный фаг обладает широким диапазоном действия в отношении возбудителя псевдотуберкулеза, но в то же время он не является строго специфичным, так как лизирует, кроме *Y. pseudotuberculosis*, штаммы *Y. pestis*. Все большую актуальность приобретают фаготерапия и фагопро-

© 2019 г. Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Погожова М.П.

* **Автор для переписки:**

Кочеткова Анна Олеговна

младший научный сотрудник ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора

E-mail: Kochetkova_AO@antiplague.ru

филактика инфекционных болезней как альтернатива использованию антибиотиков.

На сегодняшний день установлено существование у псевдотуберкулезного микроба трех обособленных серологических типов бактериофагов. Фаготипирование штаммов дает возможность составить более полный эпидемиологический анализ заболеваний, вызванных иерсиниями [5, 6]. Многообразие клинических форм псевдотуберкулезной инфекции, высокая стоимость современных лабораторных методов, отсутствие квалифицированных кадров зачастую затрудняют постановку диагноза в рядовых лабораториях, в связи с чем поиск и разработка методов современной индикации возбудителя, вызывающего заболевание, представляют собой актуальную задачу.

Целью нашего исследования явилось выделение фагов из штаммов *Y. pseudotuberculosis* различных О-сероваров и изучение их биологических свойств.

Материалы и методы

В экспериментах использовали 76 штаммов псевдотуберкулезного микроба О1–О5 сероваров, выделенных в различные годы и полученных из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Специфичность свежeweделенных фагов оценивали на 112 штаммах различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. В качестве индикаторов испытывали каждый из исследуемых штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Биологические свойства изучали по общепринятым методам [1]. Литическую активность исследовали постановкой прямой пробы с фагами [1, 2]. Специфические антифаговые сыворотки получали путем внутривенной иммунизации кроликов препаратами свежeweделенных фагов с различной морфологией корпускул в возрастающих дозах.

Результаты и обсуждение

В результате проделанной работы установлено, что эффективными индикаторными свойствами для выделения шести псевдотуберкулезных фагов из гомологичных культур О1, О3, О4, О5 сероваров обладали следующие штаммы: 1362 (О1 серовара), 310 (О3 серовара), 10368 (О4 серовара), 5344 (О5 серовара).

Свежeweделенные бактериофаги образовывали колонии двух видов: с прозрачным центром и слегка мутным ореолом неполного лизиса, диаметром 4–6 мм или полупрозрачные и прозрачные негативные колонии, диаметром 1–2 мм (табл. 1).

Таблица 1

Морфология негативных колоний фагов *Y. pseudotuberculosis*

Фаги	Типы негативных колоний	Морфология негативных колоний
Фаги <i>Y. pseudotuberculosis</i>	I	Негативные колонии с прозрачным центром и слегка мутным ореолом неполного лизиса по периферии. Диаметр 4–6 мм
	II	Полупрозрачные и прозрачные негативные колонии, диаметр 1–2 мм

Псевдотуберкулезные фаги имели сходное строение фаговых корпускул и относились к семейству *Podoviridae* или к III морфологической группе по классификации А.С. Тихоненко (1968) (табл. 2).

Фаги полностью нейтрализовались антифаговой сывороткой к псевдотуберкулезным фагам I серотипа и не давали перекрестных реакций с антифаговыми сыворотками к псевдотуберкулезным фагам II–III серотипов и чумным фагам I–IV серотипов.

Таблица 2

Характеристика используемых фагов

Фаги	Индикаторный штамм	Титр фага	Серотип фага	Морфогруппа по Bradley (1967)	Морфогруппа по А.С. Тихоненко (1968)
2344	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1367	$1,9 \times 10^8$	1	Сем. <i>Podoviridae</i>	III
2391	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1367	$2,1 \times 10^8$	1	Сем. <i>Podoviridae</i>	III
1996	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 10368	$4,2 \times 10^8$	1	Сем. <i>Podoviridae</i>	III
274	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 10368	$1,3 \times 10^8$	1	Сем. <i>Podoviridae</i>	III
1984	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 5344	$6,1 \times 10^8$	1	Сем. <i>Podoviridae</i>	III
12310	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 5344	$1,8 \times 10^8$	1	Сем. <i>Podoviridae</i>	III

Степень устойчивости бактериофагов к действию различных химических и физических факторов может служить вспомогательным тестом фенотипической характеристики. В ходе исследования было изучено влияние разных концентраций мочевины (15 и 30%), хлороформа и повышенной температуры (56, 60, 65, 70 °С) на фаги *Y. pseudotuberculosis*. Установлено, что обработка хлороформом в течение 24 часов не оказывала инактивирующего воздействия на фаговые частицы.

После контакта с 15%-ным раствором мочевины фаги *Y. pseudotuberculosis* условно распределились на 3 группы: устойчивые (40,6–91,6%), снижающие активность (0,57–6,5%) и фаг, занимающий промежуточное положение (22,14%). Раствор мочевины в концентрации 30% полностью инактивировал исследуемые бактериофаги. Исследовали влияние различных температур (56, 60, 65, 70 °С). При прогревании при температуре 56 °С титры фагов не изменялись. Инактивация происходила при температуре 65 °С в течение 30 минут (табл. 3).

Результаты, полученные при изучении специфичности выделенных псевдотуберкулезных фагов на штаммах 7 видов семейства *Enterobacteriaceae* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Sh. dysenteriae*, *S. paratyphi*, *S. typhi*, *E. coli*), выявили специфичность 1 из 6 псевдотуберкулезных фагов. Остальные фаги лизировали все взятые в опыт штаммы *Y. pestis* (15 штаммов), от 4 до 8 штаммов *Y. enterocolitica* (из 39 исследованных), а также штаммы *Sh. dysenteriae*, *S. paratyphi*, *S. typhi*, *E. coli*.

Псевдотуберкулезные фаги в своем большинстве не являются строго специфичными, так как лизируют штаммы *Y. pestis*. При сравнительном анализе литической активности свежевыделенных фагов и диагностического псевдотуберкулезного фага, выпускаемого ФКУЗ РосНИИПЧИ «Микроб», в нашем эксперименте наибольшей специфичностью обладал бактериофаг 12310 (табл. 4).

Псевдотуберкулезные бактериофаги обладали широким спектром литической активности, лизируя 87,6–100% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, а также взятые в опыт штаммы *E. coli*, *Sh. dysenteriae*, *S. paratyphi*, *S. typhi* и 10,3–20,5% штаммов *Y. enterocolitica*.

Таблица 3

Влияние химических и физических факторов на псевдотуберкулезные бактериофаги

Штаммы	Мочевина		Хлороформ	Температура			
	15%	30%		56°	60°	65°	70°
	Количество корпускул, в %			n×10 ⁸ БОЕ/мл			
2344	91,6	0	100	1,9	1,5	-	-
12310	40,6	0	100	1,8	1,3	-	-
1996	22,14	0	100	4,2	3,9	-	-
2391	6,5	0	100	2,1	1,8	-	-
274	6,0	0	100	1,3	1,0	-	-
1984	0,57	0	100	6,1	5,9	-	-

Таблица 4

Специфичность бактериофагов *Y. pseudotuberculosis*

Род (вид) бактерий	Количество штаммов	Бактериофаги						Диагн. псевдотуберкул.
		12310	2391	1996	274	1984	2344	
		Процент лизируемых культур						
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	76	100	100	95,8	98,3	87,6	100	100
<i>Y. pestis</i>	15	6,7	100	100	100	100	100	46,7
<i>Y. enterocolitica</i>	39	-	10,3	15,4	10,3	20,5	10,3	-
<i>Sh. dysenteriae</i>	13	-	7,7	23,1	-	-	15,4	-
<i>S. paratyphi</i>	15	-	133	-	-	20,5	6,3	-
<i>S. typhi</i>	13	-	23,1	15,4	15,4	-	38,5	-
<i>E. coli</i>	17	-	5,9	11,8	-	5,9	23,5	-

Лизабельность штаммов *Y. pseudotuberculosis* разных сероваров псевдотуберкулезными фагами

Серовары изуч. штам. <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Кол-во изуч. штаммов	Лизировано бактериофагами, в %					
		Из штамма I серовара		Из штамма III серовара	Из штамма IV серовара		Из штамма V серовара
		2344	2391	12310	1996	274	1984
I с/в	33	100	100	100	96,4	96,4	67,9
II с/в	8	100	100	100	87,5	100	75
III с/в	18	100	100	100	100	100	100
IV с/в	20	100	100	100	95	95	95
V с/в	2	100	100	100	100	100	100

Примечание: с/в — серовар

Изучение лизабельности штаммов *Y. pseudotuberculosis* разных сероваров исследуемыми фагами показало, что они обладали разным диапазоном действия. Бактериофаги, выделенные из штаммов 1-го и 3-го сероваров, обладали широким спектром действия, лизируя 100% из 76 изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Фаги из штаммов IV и V сероваров имели более узкий спектр действия и лизировали 67,9–100% псевдотуберкулезных штаммов (табл. 5).

Заключение

Таким образом, с помощью специально подобранных четырех индикаторных штаммов *Y. pseudotuberculosis* удалось обнаружить шесть новых псевдотуберкулезных бактериофагов. Выделенные фаги имели одинаковое строение корпускул и относились к 1 серологической группе псевдотуберкулезных фагов. Было выявлено, что изученные фаги обладают антигенной специфичностью, которая позволяет использовать этот признак при их дифференциации и идентификации. Типирующие фаги у *Y. pseudotuberculosis* отсутствуют, поэтому накопление данных о новых псевдотуберкулезных фагах, перспективных для диагностики возбудителя *Y. pseudotuberculosis*, не теряет своей актуальности.

Для полной характеристики данных бактериофагов необходимо изучить их генетические свойства. На это и будут направлены дальнейшие исследования, результаты которых будут представлены в следующих сообщениях.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги: М., 1961. — 522 с.
2. Арутюнов Ю.И. Сравнительное изучение биологических свойств чумных и псевдотуберкулезных бактериофагов / Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. — Ростов-на-Дону, 1967. — С. 382–390.
3. Гурлева Г.Г., Арутюнов Ю.И., Халяпина Е.Е. Серологическое родство и специфичность действия псевдотуберкулезных и колидизентерийных фагов // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 1981. — № 5. — С. 65–67.
4. Демина Ю.В., Ценева Г.Я., Воскресенская Е.А. и др. Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза / Методические указания. — М., 2009. — 66 с.
5. Катмакова Н.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Поиск и селекция псевдотуберкулезных бактериофагов // Ветеринарная медицина. — 2009. — № 4. — С. 19–20.
6. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: Биология и практическое применение: Пер. с англ. — М.: Научный мир, 2012. — 640 с.
7. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Романова Л.В., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е., Саямов С.Р. Характеристика чумных и псевдотуберкулезных фагов, принадлежащих к III и V морфогруппам // Современ. наукоемкие технолог. — 2004. — № 3. — с. 111.
8. Македонова Л.Д., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е. Бактериофаги *Yersinia pseudotuberculosis*: обнаружение в штаммах различных O-сероваров и их идентификация // Клин. лаб. диагност. — 2013. — № 8. — С. 52–53.
9. Македонова Л.Д., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е. Индикаторные штаммы для обнаружения и первичной идентификации бактериофагов патогенных иерсиний / Обмен веществ при адаптации и повреждении: Материалы IX Межвуз. конф. с междунар. участием. — Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ, 2010. — С. 78–80.
10. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М.: Наука, 1968. — 89 с.
11. Ценева Г.Я., Кокорина Г.И., Воскресенская Е.А., Шендерович О.А. Псевдотуберкулез и иерсиниоз. Эпидемиология, клиника, диагностика, терапия. — СПб.: ВМедА, 2005. — 52 с.
12. Ющук Н.Д., Ценева Г.Я., Кареткина К.Н., Бродов Л.Е. Иерсиниозы. — М.: Медицина, 2003. — 206 с.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

A.O. KOCHETKOVA, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA

Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

Due to the increasing role of pseudotuberculosis in human infectious pathology, laboratory diagnosis of this pathogen is of great importance. Bacteriophages are used for indication and phagotyping of bacteria, as well as accelerated indication of bacterial pathogens in various substrates. The phagotyping of strains allows a more complete epidemiological analysis of diseases caused by *Yersinia*. The search and development of methods of modern indication of the causative agent causing the disease are an urgent task, and therefore the purpose of our study was the isolation of phages from the strains of *Y. pseudotuberculosis* of various O-serovars and the study of their biological properties. Thus, using specially selected four indicator strains of *Y. pseudotuberculosis*, six new pseudotuberculosis bacteriophages were found. It was revealed also, that the studied phages have antigenic specificity, which allows to use this feature in their differentiation and identification. Typing phages in *Y. pseudotuberculosis* are absent, so the accumulation of data on new pseudotuberculosis phages promising for the diagnosis of the pathogen *Y. pseudotuberculosis* does not lose its relevance.

Keywords: pseudotuberculosis, biological properties, bacteriophages, phage typing.

ПУБЛИКАЦИИ

Handbook of Research on Food Science and Technology: Volume 2: Food Biotechnology and Microbiology / Chavez-Gonzalez M.L., Buenrostro-Figueroa J.J., Aguilar C.N. 1st ed. — Apple Academic Press, 2019. — 246 p.

Резюме. Эта серия руководств состоит из 3 томов, сосредоточенных на пищевой технологии и химии, пищевой биотехнологии и микробиологии, а также на функциональном питании и нутрицевтиках. В томах освещаются новые исследования и текущие тенденции в науке о питании и технологиях с акцентом на самые современные инновации, развивающиеся технологии и стратегии, нацеленные на поддержание качественного уровня пищи. В частности, руководства содержат соответствующую информацию по модернизации и улучшению пищевой индустрии. Во втором томе из трехтомника главы рассматривают биоактивные соединения в пищевой технологии, потенциалы и риски возникновения пигментации зерна, технологические преимущества в производстве фитаз, фитохимических молекул из пищевых отходов, контроль патогенных бактерий пищевого происхождения и т.д.

Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. Kent J.A., Bonmaraju T.V., Barmicki S.D. (Eds.). 13th ed. — Springer, 2017. — 2278 p.

Резюме. Это ценное и востребованное справочное издание предоставляет обилие информации и руководства по промышленной химии и биотехнологии. Промышленность охватывает спектр от соли и соды до химии сложных красителей, ядерную индустрию, быстро развивающуюся биотехнологическую промышленность и совсем недавно — устройства накопления электрохимической энергии и науку и технологию биотопливных элементов. Другие направления исключительного интереса в мире представлены в главах по

химии удобрений и производству пищи, изготовлению пестицидов и исследованию принципов поддерживающихся химических процессов, отнесенных к зеленой химии. Наконец, значительный объем и внимание уделены в руководстве вопросам безопасности и аварийных ситуаций. Надо заметить, что фактически все главы написаны лицами, вовлеченными в производство; так что они написаны со знанием дела.

Yeast in Biochemistry and Health: Physiologic Genomic Approaches. Sa-Correa I. (Ed.). — Springer, 2019. — 242 p. (Series: Progress in Molecular and Subcellular Biology, Book 58).

Резюме. В книге обсуждаются геномные стратегии для обеспечения целостного понимания роли дрожжей в поддержании здоровья человека и как модельных организмов в фундаментальных исследованиях или промышленном производстве. С использованием многочисленных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* и различных необычных видов дрожжей разного происхождения в ней описываются главные биологические процессы биотехнологического применения дрожжей и патогенетический контроль. Она также демонстрирует, как функциональная и сравнительная геномика и развитие геномной инженерии задействованы в современных исследованиях дрожжей. Использование дрожжей в экспериментах на моделях эукариот особенно знаменательно, когда было присуждено несколько Нобелевских премий по физиологии и медицине и химии за инновационные исследования, в которых применяли дрожжевые штаммы для выяснения молекулярных механизмов в обширном ряду физиологических процессов и заболеваний человека, таких как аутофагия, регуляция клеточного цикла и теломеразная активность. Эта книга дает полезные сведения для ученых, занятых изучением дрожжей и клиническими исследованиями, работающими с дрожжевыми инфекционными моделями, и для работников промышленности, применяющих микробиологию.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2019 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

II всероссийская молодежная школа-конференция с международным участием «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (Звенигород, 13–15 сентября 2019 г.)

13–15 сентября 2019 года в Звенигороде намечено организовать III всероссийскую молодежную школу-конференцию с международным участием «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». Организатор: Звенигородская Ботаническая станция имени С.Н. Скадовского МГУ. В программу школы-конференции включены три пленарные лекции, а также лекции и доклады в рамках четырех тематических секций: 1. Молекулярные механизмы регуляции сердечной деятельности. 2. Молекулярные механизмы регуляции тонуса сосудов. 3. Молекулярные механизмы синаптической передачи. 4. Механизмы функционирования центральной нервной системы. Мероприятие планируется открыть лекцией памяти выдающегося русского физиолога, академика РАН Е.Е. Никольского. *Информация:* <https://lomonosov.msu.ru/rus/event/5616>.

VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 16–20 сентября 2019 г.)

16–20 сентября 2019 года в Севастополе состоится VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика». Организаторы: Воронежский государственный университет, Севастопольский государственный университет, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, ООО «Биоактуаль» при поддержке Отделения сельскохозяйственных наук РАН. Будут проведены секции:

1. Пищевая, сельскохозяйственная и лесная биотехнология.
2. Медицинская биотехнология и биофармацевтика.
3. Экология, биоэнергетика и биотехнология.
4. Биоинформатика и IT.
5. Клеточная и генетическая биотехнология.
6. Инженерные аспекты биотехнологии.

7. Промышленная биотехнология и производство БАВ.

8. Биотехнология и образование. Заседание Федерального УМО в системе высшего образования по укрупненной группе специальностей и направлений подготовки 19.00.00. Промышленная экология и биотехнология.

Контакты и информация: E-mail: actbio@mail.ru. Интернет: www.actbio.ru/index.php/bio/bio.

Всероссийская научная конференция с международным участием «Инновации и традиции в современной ботанике», посвященная 150-летию со дня рождения академика В.Л. Комарова (58-е Комаровские чтения) (Санкт-Петербург, 21–25 октября 2019 г.)

21–25 октября 2019 года в Санкт-Петербурге будет проходить Всероссийская научная конференция с международным участием «Инновации и традиции в современной ботанике», посвященная 150-летию со дня рождения академика В.Л. Комарова (58-е Комаровские чтения). Организаторы конференции: ФГБУН «Ботанический институт им. В.Л. Комарова» РАН, Секция ботаники Научного совета РАН. Вопросы для обсуждения:

- биография В.Л. Комарова и судьба его научных идей: современные исследования в местах его экспедиций;
- инновационные методы и подходы в современной ботанике: примеры и достижения;
- современное состояние отдельных направлений науки о растениях;
- роль ботанических исследований в развитии экономики России: прошлое и настоящее;
- современные ботанические коллекции: проблемы поддержания, развития и информационного обеспечения;
- многотомные сводки по флоре, микобиоте и лишайнобиоте России и сопредельных стран: состояние и перспективы завершения;
- как нам подготовить новую «Флору России» (сосудистые растения) (круглый стол).

Информация: <https://www.binran.ru/science/konferentsii-i-shkoly/innovatsii-i-traditsii-v-sovremennoy-botanike>.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.06.19
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru