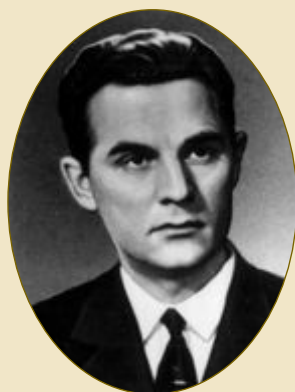


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

ВЕСТНИК
биотехнологии
и физико-химической
биологии
имени Ю.А. Овчинникова



Т. 5, № 1
2009

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

2009, Т. 5, № 1

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), М.С. Вонский (Санкт-Петербург),
В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск), В.В. Зверев (Москва),
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пуццино), М.П. Кирпичников (Москва),
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пуццино), Е.Н. Орешкин (Москва),
А.Н. Панин (Москва), Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва),
К.Г. Скрыбин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91

E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.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@biorosinfo.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2009.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Биочиповые технологии в диагностике социально значимых многофакторных заболеваний.

*О.А. Гра, Ж.М. Кожекбаева, Д.В. Гра, Ю.Ю. Федорова, О.И. Скотникова,
Н.П. Киселева, Ф.Л. Киселев, И.В. Голденкова-Павлова, Т.В. Наседкина*..... 5

Новая сайт-специфическая эндонуклеаза BspACI из *Bacillus psychrodurans* AC узнает
последовательность 5'-C↓CGC-3'/5'-G↑CGG-3'.

М.В. Тарасова, Э.К. Джанобилова, Ю.Э. Томилова, В.С. Дедков, В.А. Чернухин, С.Х. Дегтярев 16

Разработка новых подходов для оценки эпидемиологической опасности природных
очагов флавивирусных инфекций.

*О.В. Морозова, В.Н. Бахвалова, Е.И. Исаева, В.В. Панов, Л.Э. Матвеев,
Е.В. Протопопова, Stephen Seligman* 25

Краткие сообщения

Биотехнология очищения воды.

О.Г. Никитина 32

Обзоры

Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 4: биоводород.

Р.Г. Васильев..... 35

Теория и применение микробных биосенсоров для оперативного мониторинга биохимического
потребления кислорода.

О.Н. Понаморева, В.А. Арляпов, В.А. Алферов, А.Н. Решетилов 42

Биогеотехнология получения благородных и цветных металлов: состояние и перспективы.

Т.Ф. Кондратьева 49

Страницы истории

К 75-летию со дня рождения Х. Темина — исследователя, открывшего обратную транскрипцию.

В.С. Воробьев, О.В. Воробьева 63

Юбилейные и знаменательные даты 2009 года 67

Хроника

События первой половины 2009 года 73

Информация

Предстоящие мероприятия 2009 года 76

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov*4

Original articles

Biochip technologies in diagnostics of socially important multifactorial diseases.

*O.A. Gra, Zh.M. Kozhekbaeva, D.V. Gra, Yu.Yu. Fedorova, O.I. Skotnikova,
N.P. Kisseljova, F.L. Kissel'jov, I.V. Goldenkova-Pavlova, T.V. Nasedkina*5

New site-specific endonuclease BspACI from *Bacillus psychrodurans* AC
recognizes 5'-C↓CGC-3'/5'-G↑CGG-3'.

M.V. Tarasova, Z.K. Djanobilova, Yu.E. Tomilova, V.S. Dedkov, V.A. Chernukhin, S.Kh. Degtyarev..... 16

Development of new approaches to evaluation of the epidemiologic risk of the flavivirus infections
endemic regions.

*O.V. Morozova, V.N. Bakhvalova, E.I. Isaeva, V.V. Panov, L.E. Matveev,
E.V. Protopopov, Stephen Seligman*25

Short communications

Biotechnology of water refining.

O.G. Nikitina32

Reviews

Perspectives of development of biofuel production in Russia. The report 4: a biohydrogen.

R.G. Vasilov 35

Theory and application of microbial biosensors for biochemical oxygen demand detection (review).

O.N. Ponamoreva, V.A. Arlyapov, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov42

Biogeotechnological obtain noble and non-ferrous metals: status and prospects.

T.F. Kondratyeva49

Pages of history

To 75th anniversary from birthday of H. Temin, a discoverer of reverse transcription.

V.S. Vorobyev, O.V. Vorobyeva.....63

Anniversary and significant dates 2009.....67

The chronicle

Events of the first half-year 2009.....73

The information

Forthcoming actions 2009.....76

Rules for authors78

К читателям

Журнал приступил к выпуску своего 5-го тома. В первом номере помещается ряд ценных, высококлассных работ. Прежде всего, следует отметить исследование обладателя медали им. Ю.А. Овчинникова 2008 года О.А. Гра с коллегами, посвященное роли биочипов в донозологической диагностике социально значимых заболеваний разной этиологии. В работе Морозовой О.В. и др. из Новосибирска изучается актуальная для Сибири проблема диагностики флавивирусных инфекций, в особенности клещевых энцефалитов, с помощью современных методов молекулярной биологии; в ней получены существенные результаты в плане оценки эпидемиологических рисков.

По традиции печатают свою работу сотрудники НПО «Сибэнзим», являющуюся продолжением серии их монотематических публикаций. На этот раз они представили данные о новой сайт-специфической эндонуклеазе VspACI *Bacillus psychrodurans* AC.

В рубрике обзоров помещено обстоятельное рассмотрение вопроса о биосенсорах для мониторинга биохимического потребления кислорода, выполненное коллективом квалифицированных авторов под руководством профессора А.Н. Решетилова (Пушино). Редкий, крайне полезный обзор по биогеотехнологии сделан заведующим лабораторией хемолитотрофных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН д.б.н. Т.Ф. Кондратьевой. Он составлен по материалам ее доклада на Всероссийском совещании работников биотехнологической отрасли промышленности, состоявшегося 2 декабря 2008 г. в Москве и вызвавшего огромный интерес аудитории. Наконец, продолжен цикл публикаций Р.Г. Василова по биотопливу — им систематизирована современная информация по биоводороду.

Исторический раздел посвящен юбилейной дате: 75-летию со дня рождения Х. Темина — человека, совершившего одно из самых сенсационных открытий XX столетия в биологии и химии. Он доказал существование обратной транскрипции — от РНК к ДНК, что, на первый взгляд, противоречило уже устоявшейся к 60-м годам центральной догме молекулярной биологии, однако по сути своей, как оказалось, только дополняло и углубляло ее.

Как принято редколлегией нашего журнала, в первом номере всегда дается подборка юбилейных и знаменательных дат 2009 года по физико-химической биологии и биотехнологии.

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

БИОЧИПОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

О.А. ГРА^{1,2*}, Ж.М. КОЖЕКБАЕВА^{1,3}, Д.В. ГРА⁴, Ю.Ю. ФЕДОРОВА⁵, О.И. СКОТНИКОВА⁶,
Н.П. КИСЕЛЕВА⁴, Ф.Л. КИСЕЛЕВ⁴, И.В. ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА¹, Т.В. НАСЕДКИНА²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ³University of Miami Miller School of Medicine Institute for Human Genomics, Miami, Florida (USA); ⁴НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва; ⁵Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа; ⁶Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения Москвы

Донозологическая диагностика социально значимых заболеваний многофакторной этиологии в последнее время становится все более актуальной ввиду ухудшающейся экологической обстановки и увеличения числа больных с хронической патологией. В связи с этим активно исследуется ассоциация полиморфизма генов системы метаболизма аллергенов, канцерогенов и других ксенобиотиков с повышенным риском развития многофакторных заболеваний. Для анализа полиморфизма в ключевых генах системы биотрансформации нами был разработан ПФ-биочип. Проведение анализа на данном биочипе позволило определить генетические факторы риска развития ряда многофакторных патологий: острых лейкозов в детском возрасте (полиморфные варианты генов *GSTT1*, *GSTM1*, *NAT2* и *MTRR*), лейкозов и лимфом во взрослом возрасте (полиморфные варианты генов *CYP1A1*, *GSTM1* и *CYP2C9*), а также болезней легких у детей и взрослых (полиморфные варианты генов *CYP2C9*, *GSTT1*, *GSTM1* и *NAT2*). Анализ генов предрасположенности к раку шейки матки выявил факторы риска развития этой онкопатологии (полиморфные варианты генов *CYP2D6*, *GSTT1*, *MTHFR* и *NAT2*). В работе показано, что полиморфные варианты генов *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1* и *NAT2* являются прогностическими факторами риска развития рецидива острого лейкоза в детском возрасте. Полученные результаты свидетельствуют о важности проведения исследований по поиску генетических факторов риска многофакторных заболеваний и эффективности биочипов как универсального инструмента для генотипирования при донозологической диагностике и индивидуальном подборе лекарственных препаратов в клинике.

Ключевые слова: многофакторные заболевания, предиктивная диагностика, система биотрансформации, генетический полиморфизм, олигонуклеотидные биочипы.

Введение

В связи с ухудшающейся экологической обстановкой в России и в мире и увеличением числа больных хроническими заболеваниями остро встает вопрос о проведении донозологической диагностики социально значимых заболеваний многофакторной этиологии. В настоящее время показано, что прогностическими факторами риска развития социально значимых многофакторных патологий, наряду с неблагоприятными экологическими и неблагоприятными социальными условиями, являет-

ся генетически наследуемый метаболизм индивида. Вариабельность в метаболических параметрах в большинстве случаев обусловлена однонуклеотидными заменами (SNP) в кодирующих последовательностях генов, что, в свою очередь, приводит к модуляции функционирования белковых продуктов и при неблагоприятном сочетании полиморфных вариантов генов может вносить вклад в развитие определенных патологических процессов. Таким образом, генетический полиморфизм может определять наследственную предрасположенность к множеству социально значимых многофакторных заболеваний, в том числе к аллергическим (бронхиальная астма и ринит), инфекционным (туберкулез) и онкологическим заболеваниям (лимфопролиферативные заболевания и солидные опухоли) [1–6].

Статистические и эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что в России насущными про-

* Автор для переписки:

© 2009 г. Гра Ольга Алексеевна

к.б.н., ст.н.с. группы биохимической генетики ИОГен РАН

119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, 3

E-mail: olgagra@gmail.com

блемами являются своевременная диагностика и адекватное лечение аллергических, инфекционных и онкологических заболеваний [4, 5, 7–9]. В связи с этим выявление групп высокого риска развития данных заболеваний многофакторной этиологии и проведение различных превентивных мероприятий представляется одной из основных задач современной медицины. Проблема донозологической диагностики осложняется тем, что этиология многих из этих заболеваний в настоящее время окончательно не установлена. Следовательно, в контексте досимптоматической диагностики наиболее актуальными становятся исследования, посвященные поиску и идентификации генетических факторов риска развития этих патологий, с целью разработки новых скрининговых программ донозологической диагностики и профилактики данных заболеваний. Кроме того, поскольку перечисленные выше многофакторные заболевания запускаются триггерами внешней среды у индивидов с генетической чувствительностью, очень важно становится изучение работы генов системы биотрансформации, белковые продукты которых отвечают за метаболизм аллергенов, токсинов и канцерогенов, которые потенциально могут индуцировать развитие многофакторных патологий, а также участвуют в метаболизме лекарственных препаратов, используемых при лечении данных заболеваний.

Ранее в лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН был разработан ПФ-биочип для анализа полиморфизма в 10 ключевых генах системы биотрансформации *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* [10]. Данный биочип был использован для определения критериев предрасположенности, прогноза и эффективности лечения больных социально значимыми заболеваниями многофакторной этиологии в российской популяции на основании изучения генетического полиморфизма основных ферментов метаболизма ксенобиотиков и лекарственных препаратов.

Материалы и методы

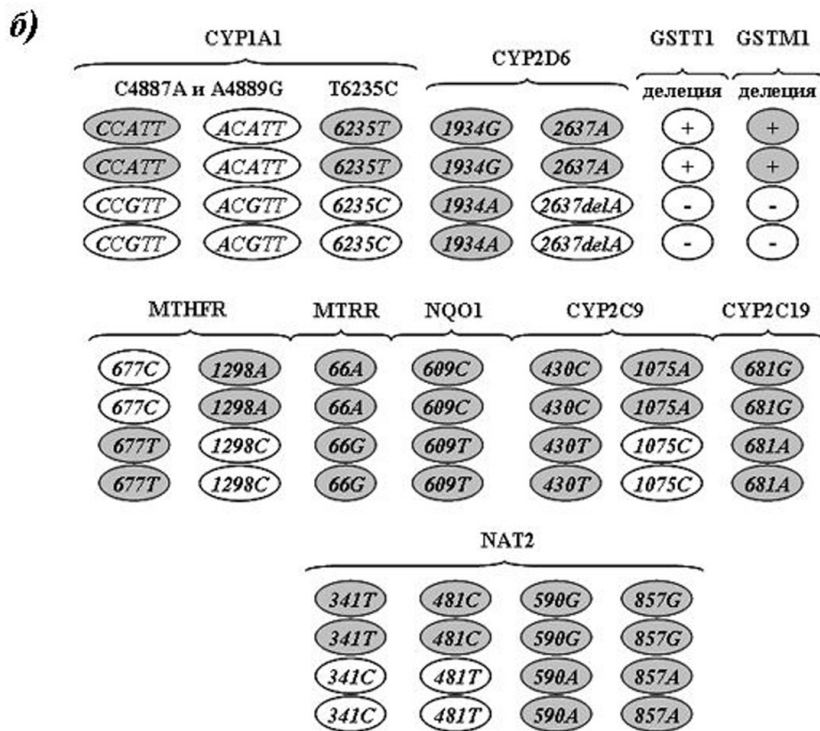
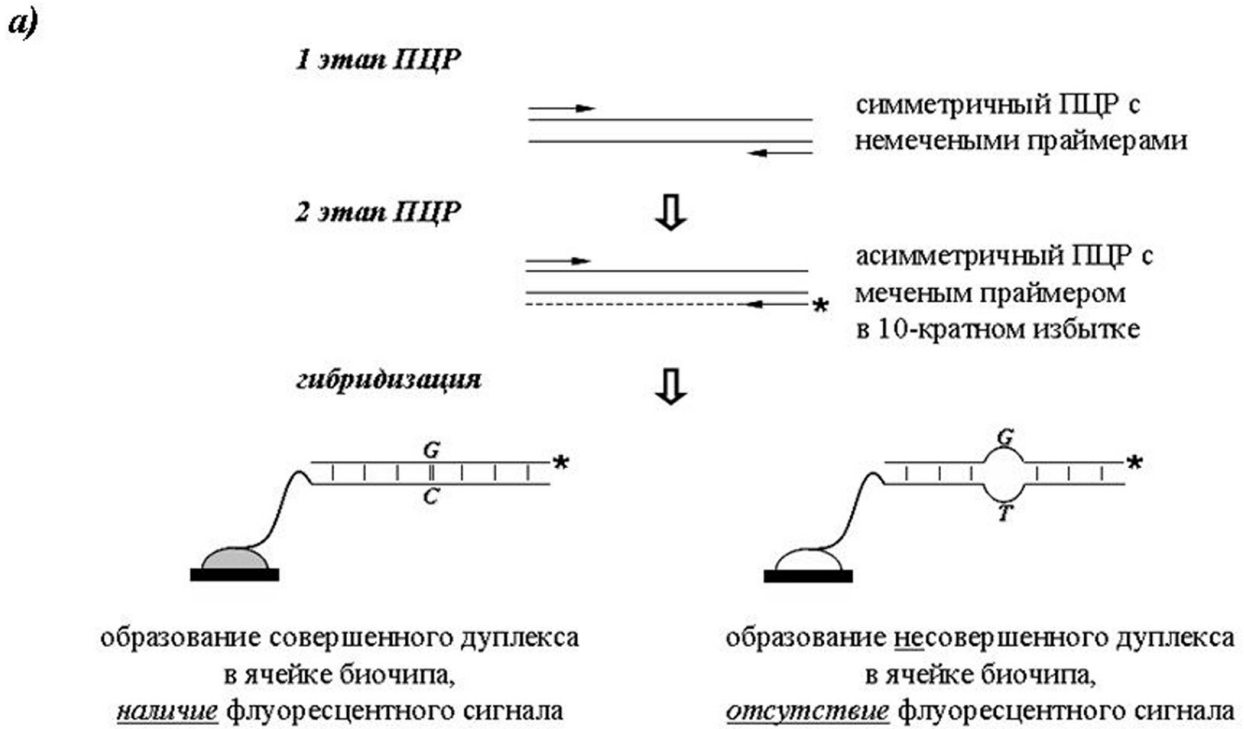
Клинические образцы. В работе использовали образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови или костного мозга с помощью набора Wizard genomic DNA purification system («Promega», США) или фенол-хлороформной экстракцией. ДНК из опухолей шейки матки выделены стандартным гуанидинизотионатным методом с разделением ДНК и РНК центрифугированием в плотной среде CsCL [11].

Синтез олигонуклеотидов и изготовление микрочипов. Олигонуклеотиды для иммобилизации на микрочипе синтезировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer («Applied Biosystems», США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конце олигонуклеотидов находился спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 («Glen Research», США). Нуклеотидные последовательности иммобилизованных олигонуклеотидов опубликованы ранее [10, 12] или могут быть получены у авторов.

Микрочипы изготовлены с помощью фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля, как описано ранее [13].

Аmplификация, гибридизация и регистрация изображения. Определение генотипов *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A, 2637delA), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), *MTHFR* (677C>T, 1298A>C), *MTRR* (66A>G), *NQO1* (609C>T), *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *CYP2C19* (681G>A) и *NAT2* (341T>C, 481C>T, 590G>A, 857G>A) проводилось посредством двухэтапной мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на биологических микрочипах (рис. 1). Типы исследованных полиморфных вариантов и последовательности праймеров опубликованы ранее [10, 12] или могут быть получены у авторов. Полученные на второй стадии мультиплексной ПЦР флуоресцентно меченные образцы использовали для гибридизации на микрочипе. Гибридизационная смесь общим объемом 30 мкл состояла из 25% формамида («Serva», США), 5xSSPE («Promega», США) и амплификата (по 3 мкл образца из каждой мультиплексной реакции). Гибридизационную смесь денатурировали при 95 °С (5 мин.), охлаждали на льду (1 мин.), наносили на биочип и оставляли на ночь при 37 °С. Далее чип отмывали в 1xSSPE в течение 10 мин. при комнатной температуре и высушивали. После проведения гибридизации флуоресцентный сигнал от ячеек микрочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware («Биочип-ИМБ», Россия), как описано ранее [10, 12].

Статистический анализ данных. Статистический анализ был проведен с применением прикладной программы GraphPad InStat (США). Для выявления взаимосвязи между полиморфными вариантами генов системы биотрансформации и развитием многофакторных



в)

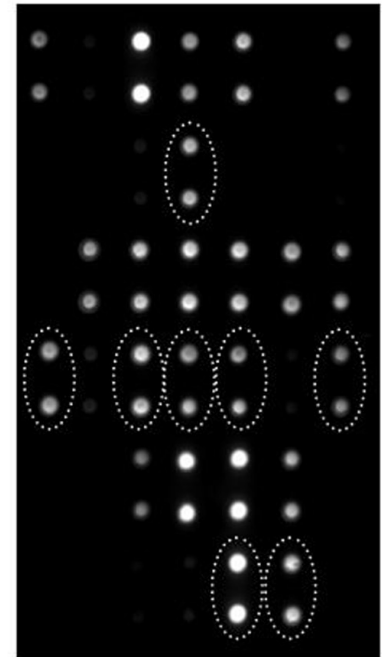


Рис. 1. **а)** Схема двухэтапной мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе (символом «*» обозначен флуоресцентно меченный праймер 2-го этапа ПЦР и флуоресцентно меченный продукт, полученный на 2-м этапе амплификации. **б)** Схема расположения олигонуклеотидов на биочипе для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации. Серым цветом выделены ячейки, которые в примере гибридизационной картины (**в**) имеют положительный сигнал, что соответствует следующему генотипу: *CYP1A1* (*1/*1), *CYP2D6* (*4/*1), *GSTT1* (-/-), *GSTM1* (+/+), *MTHFR* (T/T; A/A), *MTRR* (A/G), *NQO1* (*2/*1), *CYP2C9* (*2/*1), *CYP2C19* (*2/*1), *NAT2* (*6/*7). Пунктиром указаны полиморфные варианты, наличие которых приводит к изменению активности кодируемых данными генами ферментов

заболеваний антропогенной этиологии использовали двусторонний точный тест Фишера. Обнаруженные различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки риска развития заболевания при определенном генотипе использовался статистический параметр OR (показатель отношения шансов, odds ratio), который рассчитывался по формуле:

$$OR = \frac{a/b}{c/d},$$

где $a = n_1$, $b = N_1 - n_1$, $c = n_2$, $d = N_2 - n_2$; N_1 и N_2 — численность выборки, n_1 и n_2 — числа особей с изучаемым признаком в этих двух выборках.

Результаты и обсуждение

С помощью биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* был проведен ряд исследований ассоциаций полиморфных вариантов данных генов с риском развития заболеваний дыхательных путей и легких, а также онкологических заболеваний (онкогематологических патологий — лейкозов и лимфом — и солидных опухолей на примере рака шейки матки). Также наряду с факторами предрасположенности к различным социально значимым заболеваниям многофакторной этиологии были изучены генетические факторы риска развития рецидива острого лейкоза в детском возрасте с целью последующей индивидуальной коррекции терапевтического протокола.

1. Полиморфизм генов системы биотрансформации и риск развития туберкулеза легких во взрослом возрасте.

Туберкулез (ТБ) — это инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями туберкулеза и характеризующееся развитием клеточной аллергии и специфических гранулем в различных тканях и органах [14]. В мире ежегодно регистрируется около 8 млн. новых случаев заболевания ТБ органов дыхания, и прогноз дальнейшей динамики эпидемической ситуации остается крайне неблагоприятным [7]. Следует отметить, что ТБ является социально зависимым заболеванием, развитию которого способствуют неблагоприятные условия внешней среды в сочетании с индивидуальными характеристиками организма индивида [15, 16].

Для определения генетических факторов риска развития ТБ в настоящей работе с помощью аллель-

специфичной гибридизации на биочипе определены частоты полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *GSTT1*, *GSTM1* и *NAT2* у 73 больных ТБ (возраст от 19 до 82 лет) и проведено сравнение с частотами полиморфных вариантов данных генов у 352 здоровых индивидов (возраст от 20 до 65 лет). У больных ТБ обнаружено статистически значимое увеличение частоты «нулевого» *GSTT1* генотипа ($OR = 3,26$, $p = 2,8E-5$) и двойного «нулевого» *GSTT1/GSTM1* генотипа ($OR = 4,05$, $p = 3,4E-5$) по сравнению с группой здоровых доноров. При анализе распределения частот у больных ТБ обнаружено увеличение частоты генотипа *NAT2**5/*5 по сравнению с группой здоровых индивидов ($OR = 1,58$, $p = 0,163$). При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что у больных ТБ генотип *NAT2* *5/*5 в комбинации с «нулевым» *GSTT1* генотипом и двойным «нулевым» *GSTT1/GSTM1* генотипом встречается достоверно чаще, чем в популяционном контроле ($OR = 5,56$, $p = 0,0216$ и $OR = 12,21$, $p = 0,0135$, соответственно).

2. Полиморфизм генов системы биотрансформации и риск развития атопических заболеваний в детском возрасте.

Бронхиальная астма (БА) — это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, главной причиной развития которого является наличие генетически детерминированного состояния гиперчувствительности к различным аллергенам окружающей среды (атопии) [4, 9]. Атопическая БА имеет сходный патогенез и часто сочетается с аллергическим ринитом (АР). Также показано, что распространенность симптомов ринита при БА составляет 95% [17]. В связи с этим круг генов-кандидатов риска развития АР может быть схож с таковым при БА. Кроме того, частое сочетание бронхиальной астмы с аллергическим ринитом говорит о необходимости исследования факторов предрасположенности к астме у больных ринитом с целью доклинического выявления астматических признаков [3].

Для выяснения роли генов системы биотрансформации в развитии вышеупомянутых атопических заболеваний в работе определены частоты полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* у 82 больных БА и 105 больных АР (возраст от 1 года до 18 лет), и проведено сравнение с частотами полиморфных вариантов данных генов у 352 здоровых индивидов (возраст от 20 до 65 лет). В объединенной группе больных БА и АР обнаружено статистически значимое уменьшение частоты *CYP2C9* генотипа 430T/- по сравнению с груп-

пой здоровых доноров ($OR = 0,61, p = 0,034$). Также у больных аллергическими заболеваниями выявлено статистически значимое увеличение частоты сочетанного *CYP2C9* генотипа $430C/C, 1075C/-$ по сравнению с популяционным контролем ($OR = 1,86, p = 0,0453$). Кроме того, в данной группе больных обнаружено увеличение частоты «ненулевого» *GSTM1* генотипа ($OR = 1,35, p = 0,104$) и двойного «ненулевого» *GSTT1/GSTM1* генотипа ($OR = 1,39, p = 0,082$) по сравнению с группой здоровых доноров.

При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что у больных БА и АР «ненулевой» *GSTM1*

генотип в комбинации с *CYP2C9* генотипом $430C/C$ ($OR = 1,48, p = 0,0344$), генотипом $1075C/-$ ($OR = 2,66, p = 0,0064$) и генотипом $430C/C, 1075C/-$ ($OR = 3,02, p = 0,0048$) встречается достоверно чаще, чем в популяционном контроле (рис. 2а). Также у больных аллергическими заболеваниями выявлено статистически значимое увеличение частоты двойного «ненулевого» *GSTT1/GSTM1* генотипа в сочетании с *CYP2C9* генотипом $430C/C$ ($OR = 1,51, p = 0,0335$), генотипом $1075C/-$ ($OR = 3,42, p = 0,0029$) и генотипом $430C/C, 1075C/-$ ($OR = 3,68, p = 0,0068$), по сравнению с группой здоровых доноров (рис. 2б).

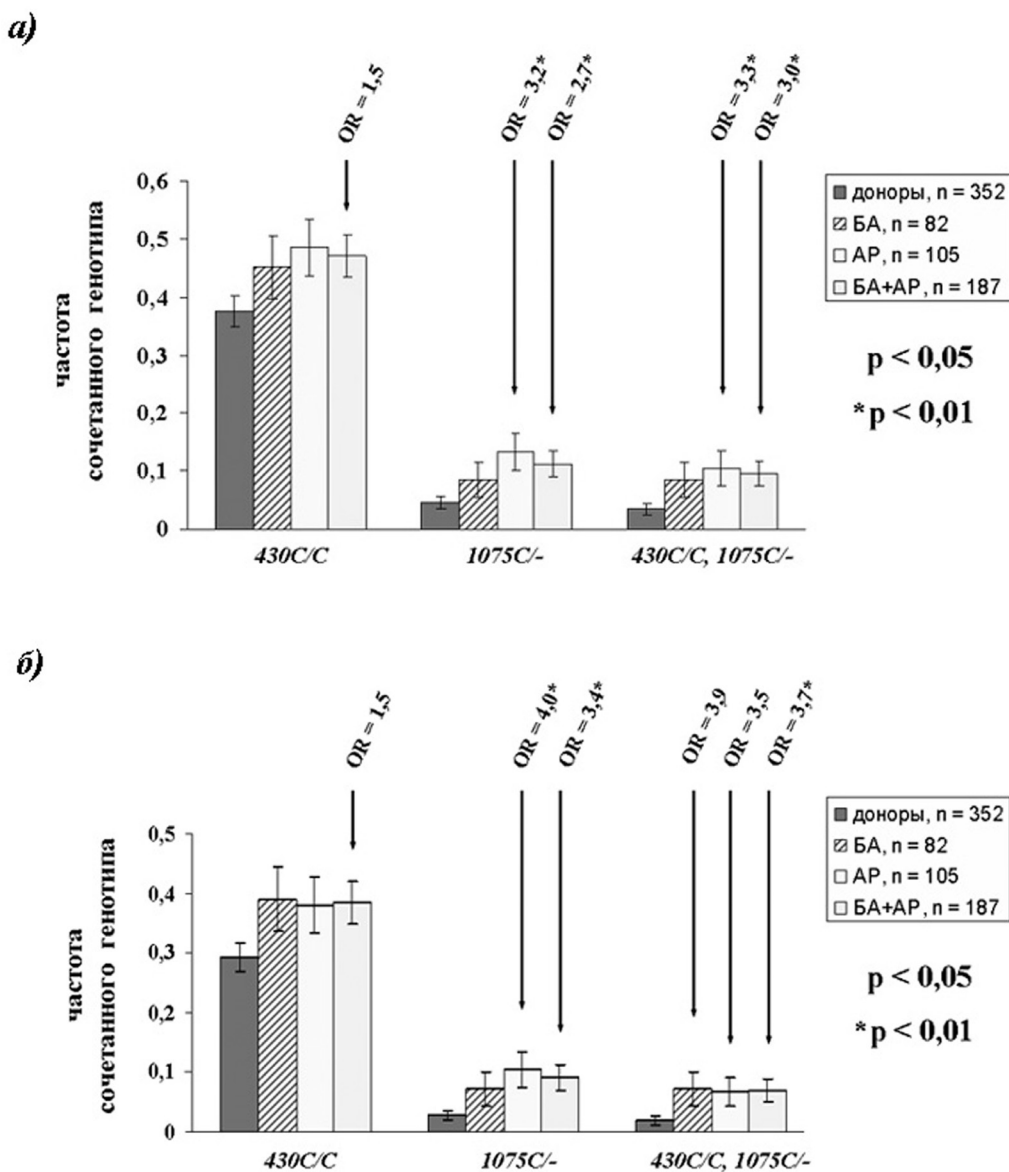


Рис. 2. Распределение *CYP2C9* генотипов в сочетании с «ненулевым» *GSTM1* генотипом (а) и двойным «ненулевым» *GSTT1/GSTM1* генотипом (б) у пациентов, больных бронхиальной астмой (БА) и аллергическим ринитом (АР), и здоровых доноров

3. Полиморфизм генов системы биотрансформации и риск развития лейкозов и лимфом в детском и взрослом возрасте.

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности у детей и взрослых, что обуславливает их высокую социальную значимость. Традиционно все опухолевые заболевания подразделяют на онкогематологические заболевания (а именно: лимфомы и лейкозы) и солидные опухоли. В свою очередь, онкогематологические заболевания подразделяют на системные заболевания — лейкозы и региональные — лимфомы.

Лейкозы — это опухолевые заболевания кровяной ткани с поражением костного мозга. Наиболее распространенной формой у детей является острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), составляющий приблизительно 80% от всех острых лейкозов. Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) у детей встречается в 15% случаев [18, 19]. Среди взрослых в наибольшей степени распространен В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (В-ХЛЛ), который встречается приблизительно в 30% всех случаев [18, 20].

Лимфомы — злокачественные опухоли лимфоидной ткани. Согласно эпидемиологическим данным, ~11% пациентов с лимфомами имеют лимфому Ходжкина, а остальные — неходжкинскую лимфому [8].

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) представляют собой группу гистологически и биологически неоднородных злокачественных новообразований лимфоидной системы с неясной этиологией. На долю НХЛ приходится 5% регистрируемых в течение года опухолей у мужчин и 4% — у женщин. При этом НХЛ являются причиной около 3% случаев смерти от новообразований [8, 21].

Для выявления факторов предрасположенности к лимфомам и лейкозам у детей и взрослых определены частоты полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* у 332 детей с диагнозом ОЛЛ (возраст от 3 месяцев до 16 лет), 71 ребенка с диагнозом ОМЛ (возраст от 1 года до 17 лет), 76 взрослых пациентов с диагнозом НХЛ (возраст от 18 до 78 лет), 83 взрослых пациентов с диагнозом В-ХЛЛ (возраст от 31 до 83 лет) и 667 здоровых доноров (возраст от 20 до 102 лет) [10, 22].

У больных НХЛ выявлено статистически значимое увеличение частоты «нулевого» *GSTM1* генотипа по сравнению с группой здоровых доноров (OR = 1,82, $p = 0,0395$).

Анализ сочетанных взаимодействий у больных В-ХЛЛ позволил выявить статистически значимое уве-

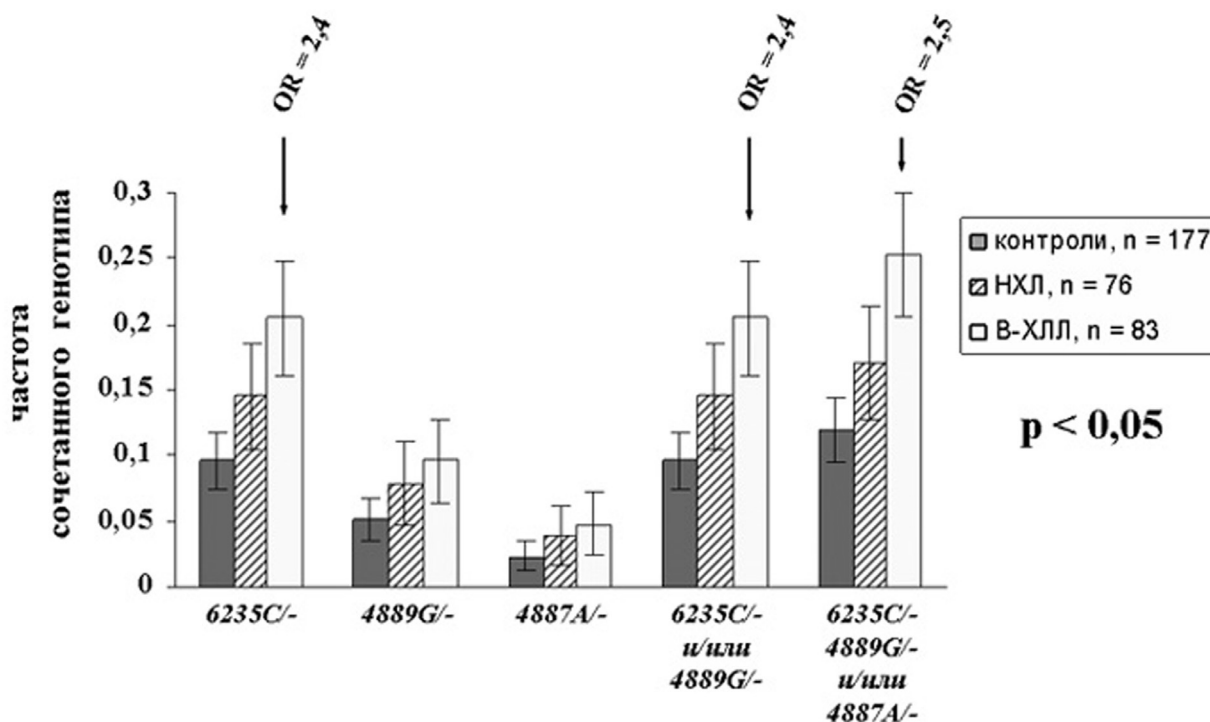


Рис. 3. Распределение *CYP1A1* генотипов в сочетании с «нулевым» *GSTM1* генотипом у пациентов, больных неходжкинскими лимфомами (НХЛ) и В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ), и здоровых доноров

личение частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *CYP1A1* и «нулевого» *GSTM1* генотипа (рис. 3): для комбинации «нулевого» *GSTM1* генотипа с *CYP1A1* генотипами 6235C/- (OR = 2,42, $p = 0,0186$); с *CYP1A1* генотипами 4887A/-, 4889G/- и/или 6235C/- (OR = 2,52, $p = 0,0106$). Помимо этого у мужчин, больных В-ХЛЛ, по сравнению с группой здоровых доноров мужского пола, выявлено достоверное увеличение частоты гетерозигот и гомозигот по *2 аллелю гена *CYP2C9* (OR = 2,38, $p = 0,0359$) и по сочетанию *2 и *3 аллелей данного гена (OR = 2,09, $p = 0,0226$) [10].

У детей, больных острыми лейкозами, обнаружено статистически значимое увеличение частоты «нулевого»

GSTT1 генотипа (OR = 1,9, $p = 4,7E-5$) и двойного «нулевого» *GSTT1/GSTM1* генотипа (OR = 3,1, $p = 2,5E-8$) по сравнению с группой здоровых индивидов (рис. 4а). Также у детей, больных острыми лейкозами, выявлено увеличение частоты *NAT2* генотипа *4/*4 в 1,8 раза по сравнению с группой здоровых доноров ($p = 0,026$).

При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что у детей, больных острыми лейкозами, генотип *NAT2* *4/*4 в комбинации с «нулевым» *GSTT1* и *GSTM1* генотипом встречается достоверно чаще, чем в популяционном контроле (рис. 4б). Помимо этого, у девочек, больных острыми лейкозами, по сравнению

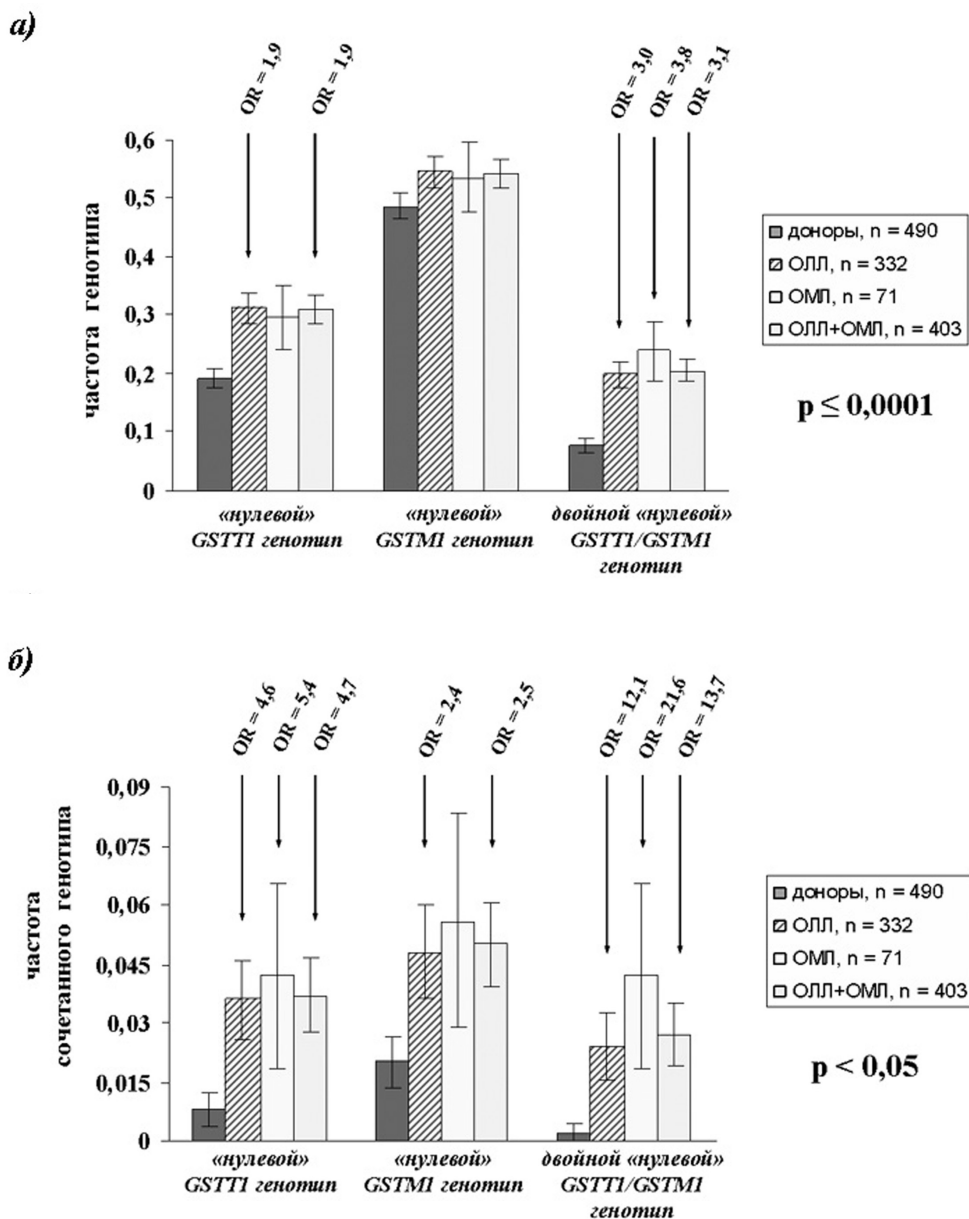


Рис. 4. Распределение «нулевых» *GST* генотипов (а) и сочетаний «нулевых» *GST* генотипов с *NAT2* генотипом *4/*4 (б) у детей, больных острыми лейкозами, и здоровых доноров

с группой здоровых доноров женского пола, обнаружено уменьшение частоты *MTRR* генотипа *66G/G* ($OR = 0,50$, $\rho = 0,0015$). При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что наличие «нулевого» *GSTT1* и *GSTM1* генотипа в комбинации с *MTRR* генотипом *66A/-* является значимым фактором риска развития острого лейкоза у девочек [22].

4. Полиморфизм генов системы биотрансформации и риск развития рецидива острого лейкоза в детском возрасте.

Есть данные, что наличие полиморфизма в генах системы биотрансформации не только вносит вклад в формирование первичных онкогематологических заболеваний (таких как лимфомы и лейкозы), но также влияет на частоту и особенности развития рецидивов [23, 24].

Для определения критериев прогноза и эффективности лечения детей, больных острыми лейкозами, на основании изучения генетического полиморфизма ключевых ферментов метаболизма ксенобиотиков и лекарственных препаратов в настоящей работе с помощью биочипа были определены частоты распределения полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* у 332 детей с диагнозом ОЛЛ (из которых 258 пациентов были с первично диагностированным ОЛЛ и 74 пациента находились в рецидиве заболевания) и у 71 ребенка с диагнозом ОМЛ (из которых 41 пациент был с первично диагностированным ОМЛ и 30 пациентов находились в рецидиве заболевания).

Было обнаружено, что аллель *CYP1A1*2A* достоверно чаще встречается у детей в рецидиве заболевания, чем у детей с первично диагностированным лейкозом ($OR = 2,03$, $\rho = 0,033$). В случае гена *GSTT1* «нулевой» генотип значительно реже встречается у детей в рецидиве заболевания, чем у детей с первичным лейкозом ($OR = 0,55$, $\rho = 0,0265$). При анализе распределения частот аллелей гена *NAT2* было выявлено, что для каждого вида лейкоза характерен определенный генотип: у пациентов с рецидивом ОЛЛ чаще встречаются генотипы *NAT2 *4/*5* и **5/*5* (**5/-*), тогда как у пациентов с рецидивом ОМЛ — генотипы **4/*6* и **6/*6* (**6/-*) по сравнению с пациентами с первичным ОЛЛ и ОМЛ, соответственно (рис. 5). При разделении пациентов по полу у девочек с рецидивом острого лейкоза было найдено уменьшение в 2,4 раза частоты встречаемости «нулевого» *GSTM1* генотипа по сравнению с группой девочек с первичным лейкозом ($OR = 0,41$, $\rho = 0,0175$) [25].

5. Полиморфизм генов системы биотрансформации и риск развития рака шейки матки у женщин.

Рак шейки матки (РШМ) — онкологическое заболевание, связанное с поражением эпителия шейки матки. За последние 5 лет абсолютное число вновь выявленных больных увеличилось на 8,9% [26]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения РШМ занимает 6-е ранговое место, что соответствует 5,2% от общего числа заболевших онкологическими заболеваниями. В России доля РШМ в структуре заболеваемости максимальна в возрастной группе 15–39 лет (19,2%). В возрастной группе 40–54 года она составляет 8,9% и занимает 2-е ранговое место после рака молочной железы, при этом смертность от РШМ составляет 4,2% от общего числа умерших от злокачественных новообразований [27].

Для выявления генетических факторов риска развития данной онкопатологии были определены частоты полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* у 85 женщин с диагнозом РШМ (возраст от 24 до 72 лет) и у 85 здоровых доноров женского пола (возраст от 43 до 102 лет). У больных РШМ обнаружено статистически значимое увеличение частоты гетерозигот по *7 аллелю гена *NAT2* ($OR = 4,08$, $\rho = 0,0316$) по сравнению с группой здоровых женщин. При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что аллель *NAT2*7* в комбинации с генотипом *CYP2D6 1934G/G* достоверно чаще встречается у женщин, больных РШМ, чем в контрольной группе ($OR = 20,49$, $\rho = 0,0032$). Помимо этого, у больных РШМ отмечено увеличение частоты «ненулевого» *GSTT1* генотипа в комбинации с генотипами *CYP2D6 1934G/G* ($OR = 2,01$, $\rho = 0,0302$) и *MTHFR 677T/T* ($OR = 5,33$, $\rho = 0,0323$) по сравнению с группой здоровых доноров женского пола.

Заключение

Таким образом, по результатам проделанной работы обнаружены следующие критерии предрасположенности:

- полиморфные варианты генов *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция) и *NAT2* (341T>C, 481C>T, 590G>A) могут модулировать риск развития социально значимых **болезней легких** у жителей Европейской части России, представителей этнически гомогенной популяции русских;

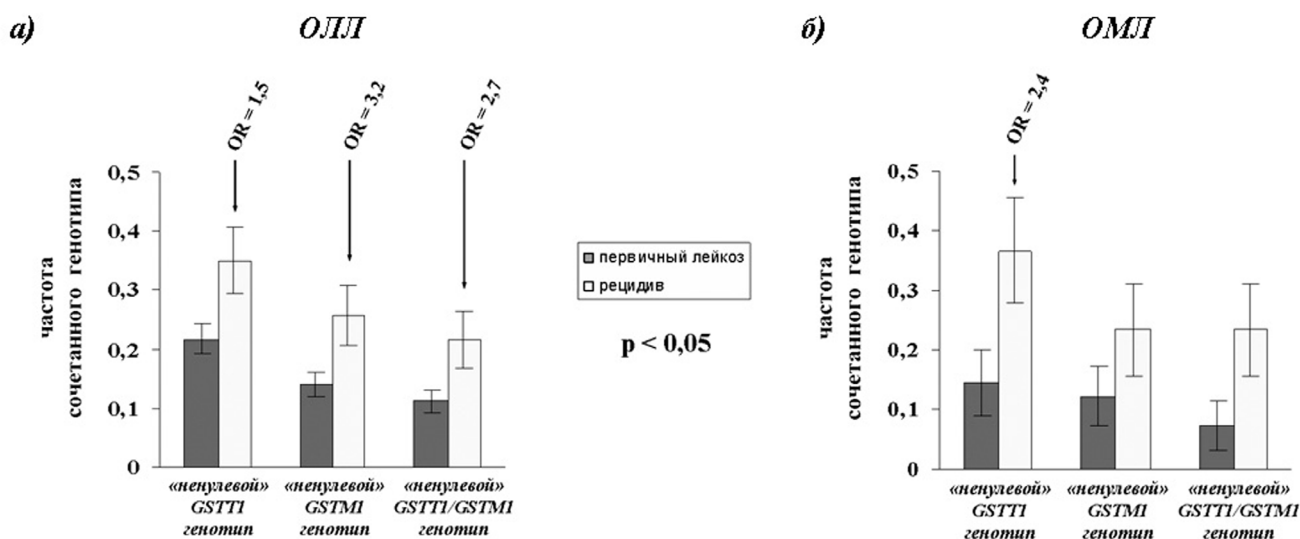


Рис. 5. Распределение «ненулевых» GST генотипов в сочетании с (а) генотипами NAT2 *4/*5 и *5/*5 (*5/-) у детей с первично диагностированным ОЛЛ и в рецидиве заболевания и (б) генотипами NAT2 *4/*6 и *6/*6 (*6/-) у детей с первично диагностированным ОМЛ и в рецидиве заболевания

- полиморфные варианты генов CYP1A1 (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), GSTM1 (делеция) и CYP2C9 (430C>T, 1075C>T) могут служить факторами риска развития **НХЛ** и/или **В-ХЛЛ** у взрослых жителей Европейской части Российской Федерации;
- полиморфные варианты генов GSTT1 (делеция), GSTM1 (делеция), NAT2 (341T>C, 481C>T, 590G>A) и MTRR (66A>G) могут рассматриваться в качестве факторов риска развития **острого лейкоза** у детей – жителей Европейской части России;
- полиморфные варианты генов CYP1A1 (6235T>C), GSTT1 (делеция), GSTM1 (делеция) и NAT2 (341T>C, 481C>T, 590G>A) являются прогностическими факторами риска развития **рецидива острого лейкоза** у детей – жителей Европейской части России;
- полиморфные варианты генов CYP2D6 (1934G>A), GSTT1 (делеция), MTHFR (677C>T) и NAT2 (857G>A) могут определять предрасположенность к развитию **рака шейки матки** у женщин – жителей Европейской части России.

Дальнейшее изучение аллельных вариантов генов, вовлеченных в патогенез социально значимых многофакторных заболеваний, позволит приблизиться к пониманию причин развития данных патологий, а также подобрать

верную тактику лечения больных при возникновении заболевания. Помимо этого, определение генетического полиморфизма в различных популяционных группах с последующим выяснением их фенотипической значимости и вклада в формирование предрасположенности к различным многофакторным заболеваниям или чувствительности к определенному спектру лекарственных препаратов поможет сформировать фундаментальную основу для генетической и метаболической паспортизации индивидов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-00708-а, № 08-04-01480-а и № 08-04-12225-офи).

Литература

1. Белицкий Г.А., Якубовская М.Г. Генетический полиморфизм и вариабельность химического канцерогенеза // Биохимия. – 2008. – Т. 73(5). – С. 675–689.
2. Dougherty D., Garte S., Barchowsky A., Zmuda J., Taioli E. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure – a literature review // Toxicol. Lett. – 2008. – Vol. 182(1–3). – P. 7–17.
3. Пузырев В.П., Степанов В.А., Назаренко С.А. Геномные исследования наследственной патологии и генетического разнообразия сибирских популяций // Молекулярная биология. – 2004. – Vol. 38(1). – P. 129–138.

4. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». — М.: Издательский дом «Русский врач», 2006. — 100 с.
5. *Sinnett D., Labuda D., Krajinovic M.* Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers — the childhood leukemia experience // *Fam. Cancer.* — 2006. — Vol. 5(1). — P. 35–47.
6. *Balalabramanian S.P., Cox A., Brown N.J., Reed M.W.* Candidate gene polymorphisms in solid cancers // *Eur. J. Surg. Oncol.* — 2004. — Vol. 30(6). — P. 593–601.
7. www.epidemiolog.ru
8. *Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M.J.* Cancer statistics, 2008 // *CA Cancer J. Clin.* — 2008. — Vol. 58(2). — P. 71–96.
9. www.ginasthma.com
10. *Gra O.A., Glotov A.S., Nikitin E.A., Glotov O.S., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V., Sudarikov A.B., Nasedkina T.V.* Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in adult Russian patients // *Am. J. Hematol.* — 2008. — Vol. 83(4). — P. 279–287.
11. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory manual. — Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
12. *Глотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Е., Юрасов Р.А., Суржигов С.А., Паньков С.В., Чудинов А.В., Баранов В.С., Заседателев А.С.* Разработка биочипа для анализа полиморфизма генов системы биотрансформации // Молекулярная биология. — 2005. — Vol. 39(3). — P. 403–412.
13. *Fotin A., Drobyshev A., Proudnikov D., Perov A., Mirzabekov A.* Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips // *Nucleic Acids Res.* — 1998. — Vol. 26(6). — P. 1515–1521.
14. *Перельман М.И., Корякин В.А.* Фтизиатрия. — М.: Медицина, 1996. — 336 с.
15. *Сельцовский П.П., Литвинов В.И.* Социальные аспекты эпидемиологической ситуации по туберкулезу. — М.: МНПЦБТ, 2004. — 224 с.
16. *Lin H.H., Ezzati M., Murray M.* Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // *PLoS Med.* — 2007. — Vol. 4(1). — P. 173–189.
17. *Огородова Л.М., Петровский Ф.И.* Аллергический ринит и сопутствующая бронхиальная астма. Механизмы взаимосвязи и подходы к фармакотерапии // Пульмонология. — 2006. — № 3. — С. 100–106.
18. *Вуд М.Э., Банн П.А.* Секреты гематологии и онкологии. — М.: Бином, 1997. — 560 с.
19. *Rosig C., Juergens H.* Aetiology of childhood acute leukaemias: current status of knowledge // *Radiat. Prot. Dosimetry.* — 2008. — Vol. 132(2). — P. 114–118.
20. *Dighiero G., Hamblin T.J.* Chronic lymphocytic leukaemia // *Lancet.* — 2008. — Vol. 371(9617). — P. 1017–1029.
21. *Хансон К.П., Имянитов Е.Н.* Эпидемиология и биология Неходжкинских лимфом // Практическая онкология. — 2004. — Т. 5(3). — С. 163–168.
22. *Гра О.А., Глотов А.С., Кожехбаева Ж.М., Макарова О.В., Наседкина Т.В.* Генетический полиморфизм GST, NAT2 и MTRR и предрасположенность к развитию острого лейкоза у детей // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 42(2). — С. 214–225.
23. *Майорова О.А., Могл М.Т., Henze G., Seeger K., Румянцев А.Г.* Полиморфизм CYP2D6 и NQO1 у детей с острым лимфобластным лейкозом // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2002. — Т. 1(1). — С. 52–59.
24. *Cheok M.H., Pottier N., Kager L., Evans W.E.* Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia // *Semin. Hematol.* — 2009. — Vol. 46(1). — P. 39–51.
25. *Gra O.A., Kozhekbaeva Zh.M., Makarova O.V., Samochatova H.V., Nasedkina T.V.* Polymorphism of biotransformation genes and risk of relapse in childhood acute leukemia // *Balkan J. Med. Genet.* — 2009 (in press).
26. *Давыдов М.И., Аксель Е.М.* Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2006 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2008. — Т. 19(2). — С. 52–90.
27. *Давыдов М.И., Аксель Е.М.* Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2006 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2008. — Т. 19(2). — С. 91–119.

BIOCHIP TECHNOLOGIES IN DIAGNOSTICS OF SOCIALLY IMPORTANT MULTIFACTORIAL DISEASES

O.A. GRA^{1,2}, Zh.M. KOZHEKBAEVA^{1,3}, D.V. GRA⁴, Yu.Yu. FEDOROVA⁵, O.I. SKOTNIKOVA⁶, N.P. KISSELJOVA⁴, F.L. KISSELJOV⁴, I.V. GOLDENKOVA-PAVLOVA¹, T.V. NASEDKINA²

¹Vavilov Institute of General Genetics, RAS; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow; ³Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, 33177 USA; ⁴Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Centre, RAMS; ⁵Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa; ⁶The Central Scientific Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Department of Health Care of Moscow.

The predictive diagnostics of socially significant diseases with a multifactorial etiology becomes more significant due to worsening of ecological conditions and increasing of the number of chronic pathologies. In this connection the association of polymorphism in allergen-, carcinogen- and others xenobiotic-metabolizing genes with the increased risk to develop multifactorial diseases is investigated actively. We developed Pharmagen-biochip for the polymorphism analysis in key genes controlling the biotransformation system. Our analysis has revealed genetic risk factors for development of several multifactorial pathologies: childhood acute leukemia (polymorphic variants of genes *GSTT1*, *GSTM1*, *NAT2* and *MTRR*), leukemia and lymphoma in adults (polymorphic variants of genes *CYP1A1*, *GSTM1* and *CYP2C9*), and the lung diseases in children and adults (polymorphic variants of genes *CYP2C9*, *GSTT1*, *GSTM1* and *NAT2*). The analysis of genes predisposing to cervical cancer has defined risk factors of oncopathology development (polymorphic variants of genes *CYP2D6*, *GSTT1*, *MTHFR* and *NAT2*). In addition, it has been showed that polymorphic variants of *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1* and *NAT2* genes may consider as predictive markers for risk of relapse in childhood acute leukemia. Our results show the importance of the genetic risk factors analysis in multifactorial diseases and the utility of biochips as universal genotyping instrument in preclinical diagnostics and personalized medicine for individual adjustment of drug dosage in clinic.

Keywords: multifactorial diseases, predictive diagnostics, biotransformation system, genetic polymorphism, oligonucleotide microchipes.

НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *Vsp*ACI ИЗ *BACILLUS PSYCHRODURANS* AC УЗНАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 5'-C ↓ CGC-3'/5'-G ↑ CGG-3'

М.В. ТАРАСОВА^{1,2*}, Э.К. ДЖАНОБИЛОВА¹, Ю.Э. ТОМИЛОВА¹,
В.С. ДЕДКОВ¹, В.А. ЧЕРНУХИН¹, С.Х. ДЕГТЯРЕВ¹

¹Научно-производственное объединение «СибЭнзим»,

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Обнаружен бактериальный штамм *Bacillus psychrodurans* AC, который представляет собой продуцент новой эндонуклеазы рестрикции *Vsp*ACI. Этот фермент является истинным изошизомером рестриктазы *Aci*I и расщепляет ДНК по непалиндромным последовательностям 5'-C ↓ CGC-3'/5'-G ↑ CGG-3' с образованием двунуклеотидных 5'-выступающих концов. Проведено исследование зависимости степени гидролиза от наличия C5-метилцитозинов в сайте узнавания рестриктазы *Vsp*ACI с использованием метилированных олигонуклеотидов. Показана никазная активность *Vsp*ACI на субстратах с последовательностью ДНК 5'-CCG(m5C)-3'/3'-GGCG-5'.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, метилирование ДНК.

Введение

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) представляют собой сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы бактерий. Согласно современной классификации, рестриктазы, узнающие асимметричные последовательности, относятся к IIA или IIS типам [1]. Такие ЭР узнают непалиндромные последовательности ДНК и производят гидролиз обеих цепей внутри или рядом с сайтом узнавания. По данным базы REBASE, существуют всего десять рестриктаз, узнающих три варианта асимметричных последовательностей, состоящих из четырех нуклеотидов [2]. В данной работе описывается один из таких ферментов — ЭР *Vsp*ACI, являющаяся изошизомером *Aci*I [3].

Рестриктазы IIA или IIS типов входят в состав систем рестрикции модификации (РМ систем), в которые, помимо них, входят одна или две ДНК-метилтрансферазы (метилазы). При наличии в клетках двух метилтрансфераз каждая из них узнает специфическую последовательность одной из двух цепей ДНК. ЭР могут быть чувствительны не только к каноническому метилированию, то есть

модификации оснований, производимой метилазой из той же системы рестрикции-модификации, но и к метилированию других оснований узнаваемой последовательности. Изучение чувствительности к метилированию различных рестриктаз имеет большое значение для анализа статуса метилирования ДНК, а также для планирования генно-инженерных работ, связанных с метилированной ДНК [4, 5, 6]. В данной работе мы провели исследование зависимости степени гидролиза ДНК ЭР *Vsp*ACI от присутствия C5-метилцитозинов в сайте узнавания.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [7]. Штамм идентифицировали по определителю [8], а также с помощью анализа последовательности нуклеотидов фрагмента гена 16S рибосомной РНК [9].

Клетки *B. species* AC выращивали в 24 колбах объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона из 1% триптона («Organotechnie», Франция), 0,5% дрожжевого экстракта («Organotechnie», Франция), 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин, рН 7,5 со встряхиванием при 30 °C в течение 40 ч. Клетки осаждали в центрифуге J2-21 («Beckman», США) в течение 30 минут в роторе JA-10 при 8000 об/мин и замораживали.

* Автор для переписки:

© 2009 г. Тарасова М.В.,

аспирант НГУ, сотрудник НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: tarasovamv@sibenzyme.ru

Выделение фермента *VspACI*. Все стадии процесса проводили при температуре 4 °С. Биомассу (50 г) суспендировали в 150 мл буфера Р (10 mM KH_2PO_4 (рН 7,3 при 25 °С), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β -меркаптоэтанол), содержащего 50 mM NaCl, 0,3 мг/мл лизоцима и 0,1 mM PMSF в течение двух часов. Разделяли клеточную суспензию на две равные части и обрабатывали обе порции ультразвуком в дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Великобритания) в ледяной бане шестью импульсами длительностью по две минуты с интервалами в 2 минуты для охлаждения суспензии. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 15000 об/мин на центрифуге J2-21 («Beckman», США). Супернатант наносили на колонку с фосфоцеллюлозой Р-11 («Whatman», Великобритания) объемом 40 мл, предварительно уравновешенной буфером Р, содержащим 50 mM NaCl, и промывали двумя объемами буфера Р (с 50 mM NaCl). Сорбированный материал элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0,2 М – 1 М в буфере Р объемом 500 мл. Собирали 50 фракций по 10 мл.

Фракции с максимальной рестриктазной активностью объединяли и наносили на колонку с гидроксилапатитом (ГАП) («Bio-Rad», США) объемом 5 мл, предварительно уравновешенным буфером Р, содержащим 0,1 М NaCl. Колонку промывали двумя объемами буфера Р с 0,1 М NaCl. Фермент элюировали линейным градиентом KH_2PO_4 10–280 mM в буфере объемом 120 мл, содержащим 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β -меркаптоэтанол, 50 mM NaCl. Собирали 30 фракций по 4 мл. Фракции, обладающие наибольшей рестриктазной активностью, объединяли и диализовали против 20 объемов буфера, содержащего 1 mM KH_2PO_4 (рН 7,3), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β -меркаптоэтанол, BSA с концентрацией 100 мкг/мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение одного часа.

Диализованный препарат наносили на колонку с гепарин-сефарозой («Bio-Rad», США) объемом 4 мл, предварительно уравновешенной буфером Р, содержащим 0,2 М NaCl. Колонку промывали двумя объемами буфера Р с 0,2 М NaCl. Элюцию фермента проводили линейным градиентом концентрации NaCl 0,2 М – 0,8 М в буфере Р объемом 120 мл. Собирали 40 фракций по 3 мл. Фракции с максимальной рестриктазной активностью объединяли, добавляли BSA до концентрации 0,1 мг/мл и диализовали против 100 мл концентрирующего буфера, содержащего 50%-ный раствор глицерина, 10 mM KH_2PO_4 (рН 7,3 при 25 °С), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β -меркаптоэтанол, 0,1 М NaCl.

Определение оптимальных условий активности *VspACI*. Для определения оптимального буфера для работы фермента использовали 6 стандартных буферов (НПО «СибЭнзим», Россия): буфер В – 10 mM Tris-HCl (рН 7,6 при 25 °С), 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT; буфер G – 10 mM Tris-HCl (рН 7,6 при 25 °С), 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT; буфер O – 50 mM Tris-HCl (рН 7,6 при 25 °С), 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 1 mM DTT; буфер W – 10 mM Tris-HCl (рН 8,5 при 25 °С), 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 1 mM DTT; буфер Y – 33 mM Tris-ацетат (рН 7,9 при 25 °С), 10 mM магний-ацетат, 66 mM калий-ацетат, 1 mM DTT; буфер K – 10 mM Tris-HCl (рН 7,6 при 25 °С); 10 mM MgCl_2 ; 100 mM KCl; 1 mM DTT.

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 мкг ДНК фага λ , 1 мкл препарата *VspACI* в соответствующем реакционном буфере, делали 4 последовательных разведения в 2 раза, инкубировали 15 минут при комнатной температуре.

После установления оптимального буфера определяли наиболее подходящую температуру в реакционной смеси с установленным оптимальным буфером в 4 последовательных разведениях в 2 раза. Реакцию проводили при 5 различных температурах: 20, 30, 37, 45 и 55 °С в течение 10 минут.

Определение рестриктазной активности в профиле. Активность рестриктазы в хроматографическом профиле тестировали по наличию специфического гидролиза ДНК фага λ , инкубированной с аликвотами из фракций. Для этого отбирали из фракций аликвоты по 2,5 мкл и добавляли к 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 мкг ДНК фага λ в SE-буфере 4 (W).

Смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Продукты реакции разделяли в 1%-ном растворе агарозного геля, окрашивали раствором бромистого этидия и наблюдали в УФ-свете. За единицу активности (ед) принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ в течение 1 часа при температуре 37 °С в 20 мкл реакционной смеси.

Определение специфичности и эндонуклеазы рестрикции *VspACI*. В качестве субстратов для определения сайта узнавания *VspACI* использовали ДНК фагов лямбда и T7 и плазмиду pUC19. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 1,5%-ном растворе агарозного геля в трис-ацетатном буфере. Для определения позиции гидролиза узнаваемой последовательности рестриктазой *VspACI* использовали два комплементарных друг другу олигонуклеотида:

3M 5'-CGTGAATTCACGAGGGCCCGCTCCTCGATCCGT-3'
 4M 5'-ACGGATCGAGGAGCGGGCCCTCGTGAATTCACG-3'

Одну из цепей олигонуклеотидного ДНК-дуплекса 3M/4M метили с помощью γ -[³²P]-АТФ и T4-полинуклеотидкиназы.

Определение чувствительности эндонуклеазы BspACI к метилированию сайта узнавания. Для определения чувствительности эндонуклеазы BspACI

к метилированию сайта узнавания были использованы шесть олигонуклеотидов, два из которых — это указанные выше 3M и 4M; остальные четыре олигонуклеотида отличаются наличием метильной группы на одном из цитозинов в сайте узнавания (сайт узнавания эндонуклеазы BspACI подчеркнут):

4M 5'-ACGGATCGAGGAGCGGGCCCTCGTGAATTCACG-3'
 3M 5'-CGTGAATTCACGAGGGCCCGCTCCTCGATCCGT-3'
 4MC-0 5'-ACGGATCGAGGAG(m5C)GGGGCCCTCGTGAATTCACG-3'
 3MC-1 5'-CGTGAATTCACGAGGGC(m5C)CGCTCCTCGATCCGT-3'
 3MC-2 5'-CGTGAATTCACGAGGGCC(m5C)GCTCCTCGATCCGT-3'
 3MC-3 5'-CGTGAATTCACGAGGGCCCG(m5C)TCCTCGATCCGT-3'

Для удобства обозначим первый цитозин верхней цепи 5'-CCGC-3' С-1, второй — С-2, третий — С-3, а цитозин нижней цепи 5'-GCCG-3' — С-0. Олигонуклеотиды 3M/С-1, 3M/С-2, 3M/С-3 отличаются от 3M наличием метильных групп на С-1, С-2, С-3, соответственно, 4M/С-0 от 4M — метильной группой на С-0. Для каждого дуплекса были отдельно помечены верхняя и нижняя цепь и проведен гидролиз BspACI.

Также в качестве субстратов для определения зависимости гидролиза ДНК эндонуклеазой BspACI от наличия метилированных оснований в сайте узнавания были использованы две плазмиды: pFsp4HI [10] и pMНspAI [11]. Реакционную смесь объемом 20 мкл, содержащую 1 мкг плазмидной ДНК в SE-буфере 4 (W), обрабатывали 1 мкл препарата эндонуклеазы BspACI. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Продукты реакции разделяли в 1%-ном растворе агарозного геля, окрашивали раствором бромистого этидия и наблюдали в УФ-свете.

Построение теоретических картин гидролиза плазмид рестриктазой BspACI. Теоретические картины гидролиза плазмид были сконструированы с помощью программы Vector NTI путем редактирования последовательности плазмид. Для каждого случая блокирования гидролиза по определенным сайтам метилируемые цитозины, входящие в эти сайты, были заменены на N. Это приводило к блокированию гидролиза этих последовательностей рестриктазой BspACI, и, следовательно, такая теоретическая картина показывает набор фрагментов ДНК, образующихся при гидролизе рестриктазой BspACI в случае блокирования активности фермента вследствие присутствия метилированного основания.

Все исходные олигонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия). Продукты ферментативного гидролиза разделяли электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Personal Molecular Imager («Bio-Rad laboratories, Inc.», США).

Все использованные ферменты и маркеры молекулярной массы ДНК произведены в НПО «СибЭнзим». ДНК-маркер 1 kb содержит фрагменты ДНК со следующими длинами (п.н.): 1500; 1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100.

Результаты и обсуждение

Микроорганизм-продуцент нового фермента был выделен нами из почвенных изолятов, как описано ранее [12, 13], и депонирован в Коллекции культур микроорганизмов НПО «СибЭнзим» под номером 6M92. Клетки штамма представляют собой подвижные грамположительные палочки размером 0,7x(2–6) мкм. Споры сферические, располагаются терминально, не раздувают спорангии. Клетки аэробные, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, растут при температуре от 15 до 40 °С. На питательном агаре при 30 °С образуют круглые, от 1 до 4 мм в диаметре, немного выпуклые, гладкие, блестящие, серовато-бежевые, полупрозрачные колонии. Содержание G+C в ДНК штамма, определенное по методу [14], составляет 36%. Идентификация по определителю Берги [8] позволила отнести изучаемый штамм к роду *Bacillus*. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности начального и конечного участков гена 16S РНК (по 400 п.н.) исследуемого штамма с последовательностями генов 16S РНК бактерий

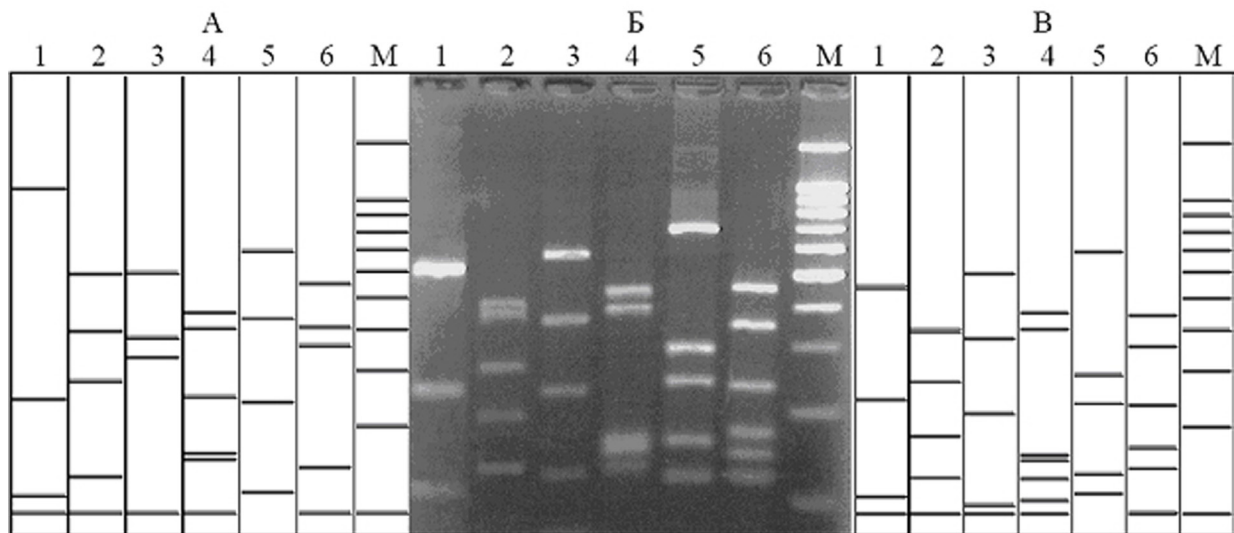


Рис. 1. **А, В** — теоретические картины гидролиза рестриктазами Sse9I, Tru9I, BsuRI, MspI, BstMBI и RsaI гена 16S РНК штаммов, относящихся к видам *Bacillus psychrotolerans* и *Bacillus psychrodurans*, соответственно.
Б — расщепление рестриктазами Sse9I, Tru9I, BsuRI, MspI, BstMBI и RsaI ПЦР-продукта гена 16S РНК исследуемого штамма

из базы данных Ribosomal database project [9] выявил его сходство с двумя видами рода *Bacillus* — *Bacillus psychrodurans* и *Bacillus psychrotolerans*. Определение вида микроорганизма по структуре гена 16S РНК исследуемого штамма проводили, как описано ранее [15]. На рисунке 1 приведена электрофореграмма продуктов гидролиза гена 16S РНК рядом эндонуклеаз рестрикции и даны теоретические картины расщепления гена 16S РНК бактерий *Bacillus psychrodurans* и *Bacillus psychrotolerans* по сайтам узнавания этих рестриктаз. Как видно из рисунка 1, картины гидролиза рестриктазами гена 16S РНК исследуемого штамма более соответствуют первичной структуре данного фрагмента ДНК бактерии *Bacillus psychrodurans*, однако полного соответствия не наблюдается. Таким образом, хотя исследуемый микроорганизм по всем признакам близок к виду *Bacillus*

psychrodurans, но в условиях неполного совпадения их свойств мы назвали новый фермент VspACI в соответствии с номенклатурой [16].

В результате наработки культуры клеток штамма *B. psychrodurans* АС было получено 50 г биомассы с активностью 5000 ед/г. После хроматографической очистки из данного количества биомассы было получено 4 мл препарата эндонуклеазы рестрикции VspACI с концентрацией 3000 ед/мл. Оптимальным реакционным буфером для работы фермента оказался SE-буфер 4 (W), замена NaCl на KCl не изменяла картины гидролиза (рис. 2). Активность фермента во всех шести буферах представлена в таблице 1. Температурный оптимум, соответствующий максимальной активности фермента, приходится на 30 °С (рис. 3). Следовательно, оптимальный буфер для изучаемой нами рестриктазы VspACI

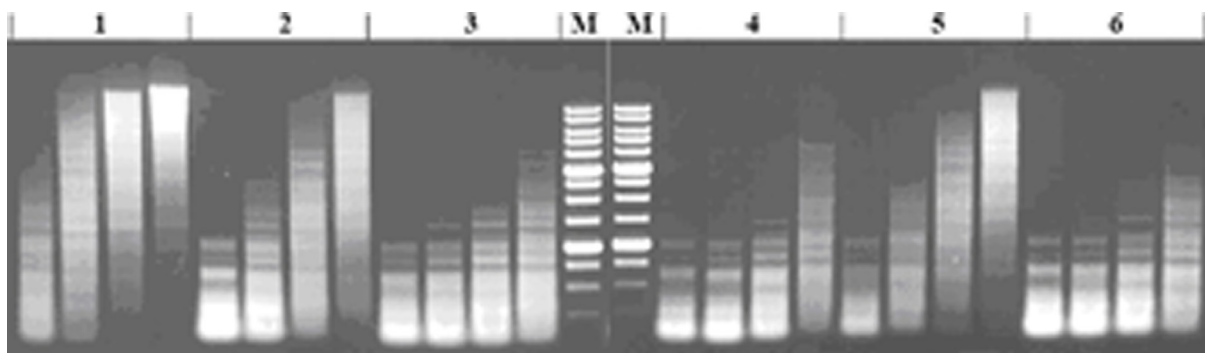


Рис. 2. Определение оптимального реакционного буфера для работы рестриктазы VspACI. 1 — буфер В, 2 — буфер G, 3 — буфер O, 4 — буфер W, 5 — буфер Y, 6 — буфер K. М — ДНК-маркер 1 kb

Таблица 1.

Активность рестриктазы *VspACI* в различных реакционных буферах

	SE буфер					
	B	G	O	W	Y	K
Активность (в процентах от максимальной)	10–25	25–50	75–100	100	25–50	100

совпадает с таковым для ее прототипа *AciI*, оптимальная температура же слегка отличается (30 °C – для *VspACI* и 37 °C – для *AciI*) [17].

Для определения последовательности узнавания фермента мы проводили гидролиз ДНК фагов T7 и лямбда, а также плазмиды pUC19 рестриктазой *VspACI* и сравнивали полученные электрофореграммы (рис. 4) с теоретически рассчитанными картинами расщепления

ДНК по сайтам узнавания более чем 260 известных на сегодня рестриктаз [2].

Сравнение показало, что экспериментально полученные электрофореграммы продуктов гидролиза всех трех ДНК соответствуют картинам их расщепления по последовательности нуклеотидов 5'-CCGC-3', которая является сайтом узнавания эндонуклеазы рестрикции *AciI*.

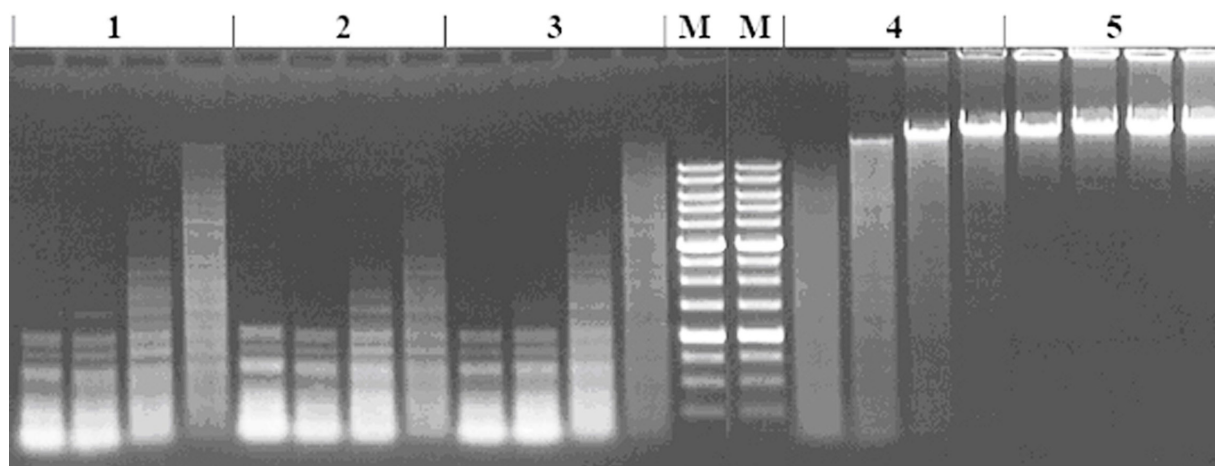
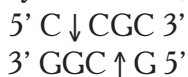


Рис. 3. Определение оптимальной температуры реакционной смеси для работы рестриктазы *VspACI*. 1 – 20 °C, 2 – 30 °C, 3 – 37 °C, 4 – 45 °C, 5 – 55 °C. М – М – ДНК-маркер 1 kb

Для подтверждения установленной последовательности узнавания и определения места гидролиза ДНК ферментом *VspACI* мы проводили гидролиз олигонуклеотидного дуплекса 4М/3М, содержащего последовательность 5'-CCGC-3', а также сайты узнавания рестриктаз *ApaI* (5'-GGGCC-3') и *AccBSI* (5'-GAGCGG-3').

На рисунке 5 представлены результаты проведенного эксперимента, из которых следует, что *VspACI* расщепляет олигонуклеотидный дуплекс в тех же позициях, что и *ApaI* и *AccBSI*. Следовательно, эндонуклеаза рестрикции *VspACI* узнает последовательность ДНК



и расщепляет ее, как указано стрелками, являясь истинным изошизомером рестриктазы *AciI* [17].

Для исследования зависимости активности рестриктазы *VspACI* от наличия 5-метилцитозина в сайте узнавания мы проводили гидролиз соответствующих олигонуклеотидных дуплексов (рис. 6). Как видно из рисунка 6, наличие 5-метилцитозина в первом положении сайта узнавания (5'-(m5C)CGC-3') или в комплементарной цепи (5'-G(m5C)GG-3') полностью исключает гидролиз ДНК. В то же время модификация второго или третьего цитозина в сайте узнавания препятствует гидролизу нижней цепи ДНК и частично (для второго) или полностью (для третьего) блокирует расщепление верхней цепи ДНК. Таким образом, модификация первого цитозина в верхней цепи и единственного цитозина в нижней цепи, вероятно, соответствует каноническому метилированию сайта узнавания изучаемой РМ системы *VspACI*.

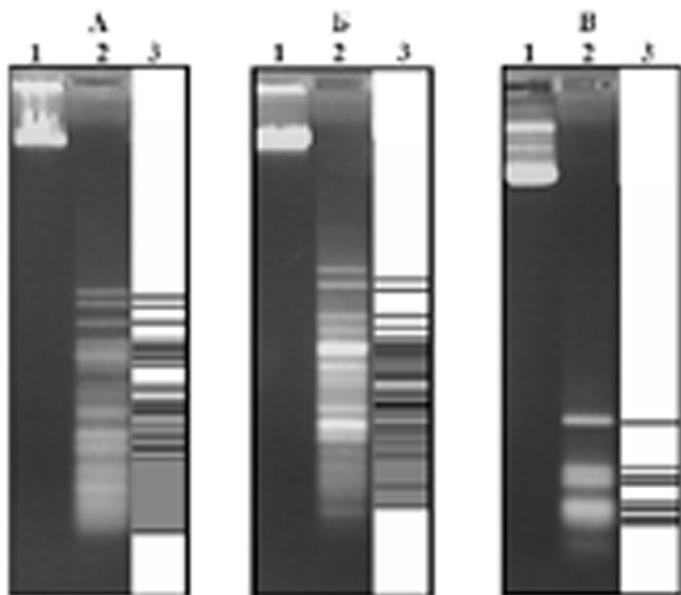


Рис. 4. Расщепление эндонуклеазой рестрикции BspACI различных ДНК.
А – ДНК фага лямбда; **Б** – ДНК фага Т7; **В** – pUC19; 1 – интактная ДНК; 2 – ДНК, обработанная рестриктазой BspACI; 3 – теоретическая картина гидролиза ДНК рестриктазой BspACI

Для подтверждения полученных данных и их сравнения с результатами расщепления протяженных молекул ДНК мы проводили гидролиз плазмидных ДНК, содержащих частично метилированные сайты узнавания BspACI. В работе использовали плазмиды pFsp4HI1 и pHspAI1. Первая является плазмидой pMTL22 [18] со встроенным геном метилазы M.Fsp4HI, модифицирующей второй цитозин в последовательности 5'-GCNCGC-3'. Вторая представляет собой плазмиду pUC19 [19] со встроенным геном метилазы M.HspAI, модифицирующей первый цитозин в последовательности 5'-CCGC-3'.

В случае плазмиды pHspAI1 возможен единственный вариант перекрытия сайтов узнавания рестриктазы BspACI и метилазы M.HspAI, когда метилированный цитозин оказывается в сайте узнавания BspACI: 5'-CCG(m5C)GC-3' / 3'-GGCG(m5C)G-5' (здесь и далее сайт узнавания BspACI подчеркнут).

В соответствии с полученными результатами по гидролизу олигонуклеотидов, расщепление такой последовательности ДНК должно происходить только по нижней цепи с образованием одноцепочного разрыва. На рисунке 7А представлены теоретические картины полного гидролиза плазмиды pHspAI1 (рис. 7А-1) и с учетом блокирования расщепления вышеуказанной последовательности (рис. 7А-2).

На рисунке 7Б-1 приведены экспериментально полученные результаты гидролиза плазмиды pHspAI1 рестриктазой BspACI. Как видно из рисунка, действительно не происходит образование фрагментов 174 и 47 п.н., но появляется фрагмент ДНК длиной 221 п.н. Аналогично вместо пары фрагментов 77 и 44 мы наблюдаем появление фрагмента 121 п.н. Единственное отличие экспериментального гидролиза плазмиды pHspAI1 от соответствующей теоретической картины заключается в отсутствии на электрофореграмме фрагмента длиной 66 п.н. Внутри этого фрагмента на расстоянии 10 п.н. от его края находится описанная выше последовательность 5'-CCG(m5C)GC-3' / 3'-GGCG(m5C)G-5', при расщеплении которой изучаемый фермент выступает в роли никазы, гидролизуя лишь нижнюю цепь. Вносимый в этот фрагмент ник обуславливает отщепление одноцепочечного олигонуклеотида длиной 10 н., что приводит к образованию гибридного фрагмента ДНК 56 н./66 н.

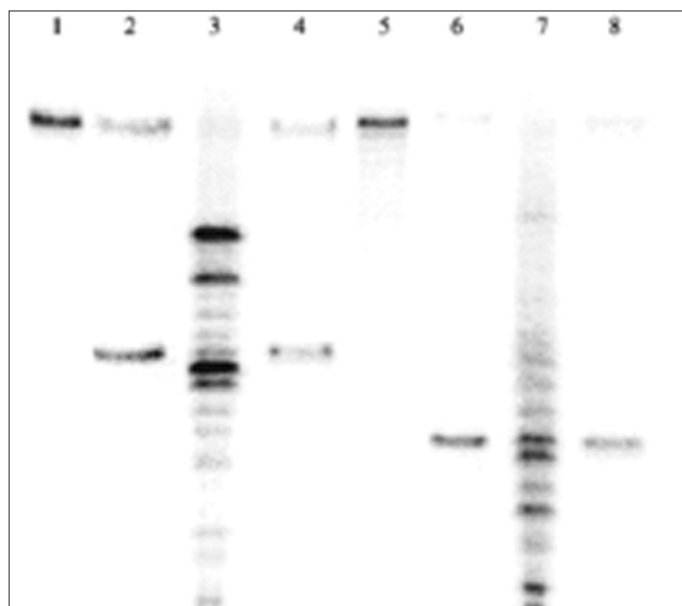


Рис. 5. Определение позиции гидролиза эндонуклеазой рестрикции BspACI. Электрофореграмма 20%-ного ПААГ.

Дорожки: 1 – олигонуклеотидный дуплекс 4M*/3M; 2 – дуплекс 4M*/3M, обработанный BspACI; 4 – дуплекс 4M*/3M, обработанный ApaI; 5 – дуплекс 4M/3M*; 6 – дуплекс 4M/3M*, обработанный BspACI; 8 – дуплекс 4M/3M*, обработанный AccBSI; дорожки 3 и 7 – маркеры, полученные частичным гидролизом экзонуклеазой III из *E.coli* олигонуклеотидных дуплексов 4M*/3M и 4M/3M*, соответственно (знак * обозначает меченые олигонуклеотиды)

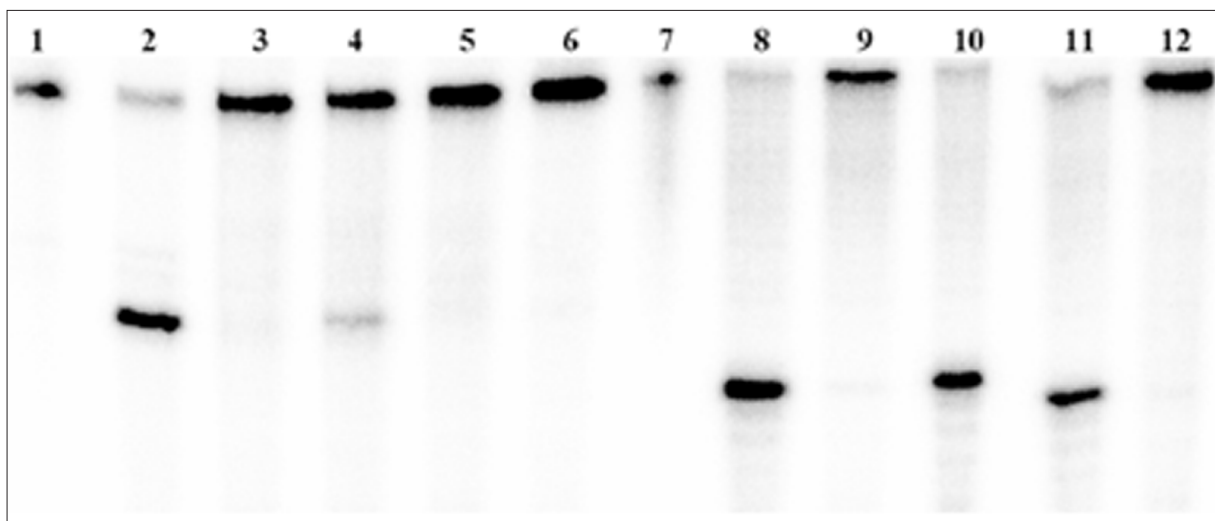


Рис. 6. Результат расщепления олигонуклеотидных дуплексов рестриктазой *Bsp*ACI. Дорожки 2–6, 8–12 – олигонуклеотиды, обработанные рестриктазой *Bsp*ACI. Дорожки: 1 – 3М*, 2 – 3М*/4М; 3 – 3МС-1*/4М; 4 – 3МС-2*/4М; 5 – 3МС-3*/4М; 6 – 3М*/4МС-0; 7 – 4М*, 8 – 3М/4М*; 9 – 3МС-1/4М*; 10 – 3МС-2/4М*; 11 – 3МС-3/4М*; 12 – 3М/4МС-0* (знак * обозначает меченые олигонуклеотиды)

Для плазмиды *pFsp4HI1* существуют два варианта пересечения сайтов узнавания рестриктазы *Bsp*ACI и метилазы *M.Fsp4HI*, когда метилированный цитозин оказывается в сайте узнавания *Bsp*ACI. В первом случае, как и в плазмиде *pHspA11*, метилированным оказывается третий цитозин сайта узнавания *Bsp*ACI: 5'-CCG(m5C)NGC-3'/3'-GGCGN(m5C)G-5'. Второй вариант перекрытия – 5'-G(m5C)CGC-3'/3'-CGG(m5C)G-5' соответствует предполагаемому каноническому метилированию, и в этом случае гидролиз должен блокироваться по обеим цепям.

На рисунке 7В представлены теоретические картины полного расщепления плазмиды *pFsp4HI1* по сайту узнавания рестриктазы *Bsp*ACI (рис. 7В-2) и с учетом блокирования гидролиза (рис. 7В-1).

На рисунке 7Б-2 приведены результаты гидролиза плазмиды *pFsp4HI1* рестриктазой *Bsp*ACI. Как видно из данного рисунка, в результате блокирования гидролиза происходит образование фрагментов ДНК 231, 211, 208, 146, 119 и 50 п.н. из следующих комбинаций мелких фрагментов: 121 и 110, 121 и 44(×2), 109 и 99, 127 и 19, 91 и 28, 43 и 7 п.н., соответственно.

Результаты исследования чувствительности к метилированию рестриктазы *Bsp*ACI, полученные в нашей работе, соответствуют имеющимся данным для *AciI*. Изучение *AciI* показало наличие 25%-ного гидролиза ДНК при метилировании второго цитозина и блокирование гидролиза при наличии метильных групп на третьем цитозине и цитозине в нижней цепи [2].

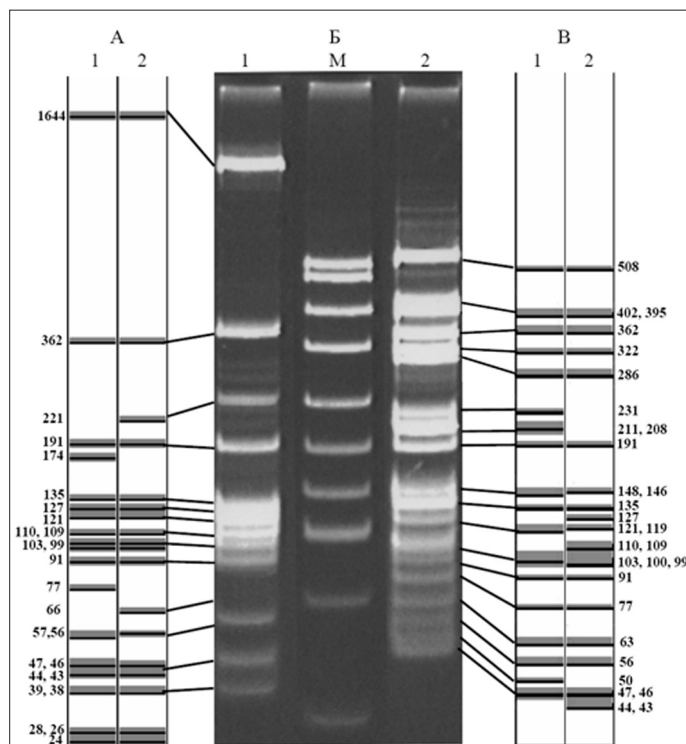


Рис. 7. Гидролиз плазмид *pHspA11* и *pFsp4HI1* рестриктазой *Bsp*ACI.

А – теоретическая картина гидролиза плазмид *pHspA11* (1) и *pHspA11/C3* (2) рестриктазой *Bsp*ACI; **Б** – расщепление плазмид *pHspA11* (1) и *pFsp4HI1* (2) рестриктазой *Bsp*ACI; **В** – теоретическая картина гидролиза плазмид *pFsp4HI1/C1-C0-C3* (1), *pFsp4HI1* (2) рестриктазой *Bsp*ACI. М – маркер молекулярной массы *pUC/MspI*

Заключение

Таким образом, рестриктазная активность эндонуклеазы *BspACI* блокируется метилированием любого из цитозинов в узнаваемой последовательности ДНК 5'-C ↓ CGC-3' / 5'-G ↑ CGG-3', кроме второго цитозина, при метилировании которого гидролиз блокируется лишь частично. Соответственно ДНК млекопитающих, содержащая метилированный CG-динуклеотид внутри сайта узнавания или перекрывающийся с ним в последовательности 5'-CCG(m5C)G-3' / 3'-GGCG(m5C)-5', не будет гидролизоваться с образованием фрагментов ДНК; однако в последнем случае будет происходить образование ников в нижней цепи сайта узнавания. Полученные нами данные надо также учитывать при гидролизе рестриктазой *BspACI* препаратов ДНК, обработанных метилазами *M.HspAI*, *M.Fsp4NI*, *M.SssI*, *M.FauIA*, *M.FauIB* и другими метилтрансферазами, которые модифицируют цитозины, входящие в сайт узнавания *BspACI*.

Литература

1. *Pingoud A. and Jeltch A.* Structure and function of type II restriction endonucleases structure and function of type II restriction endonucleases // *Nucleic Acid Res.* — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.
2. <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>.
3. *Polisson C. and Morgan R.* *AciI*, a unic restriction endonuclease from *Arthrobacter citreus* which recognizes 5' CCGC 3' // *Nucleic Acid Res.* — 1990. — Vol. 18. — P. 5911.
4. *McClelland M.* The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage // *Nucleic Acids Res.* — 1981. — Vol. 9. — P. 5859–5866.
5. *McClelland M. et al.* Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22 — P. 3640–3659.
6. *McClelland M.* The frequency and distribution of methylatable DNA sequences in leguminous plant protein coding genes // *J. Mol. Evol.* — 1983. — Vol. 19. — P. 346–354.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. — М., 1995.
8. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта.: 8-е издание: Пер. с англ. к.б.н. С. Ш. Тер-Казарьяна под ред. чл.-корр. АН СССР Г.А. Заварзина. — М., 1980.
9. <http://rdp.cme.msu.edu>.
10. *Чмуз Е.В. и др.* Клонирование генов, сравнительный анализ структуры белков системы рестрикции-модификации *Fsp4NI* и биохимическая характеристика рекомбинантной

ДНК-метилтрансферазы *M.Fsp4NI* // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41. — С. 43–50.

11. *Чернухин В.А. и др.* Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)^GC-3' // *Биотехнология.* — 2006. — № 4. — С. 31–35.
12. *Дедков В.С., Погребняк В.Б.* Определение эндонуклеаз рестрикции в лизатах из отдельных колоний бактерий и измерение активности *BamHI*, *PstI* и *MspI* у бактерий, выращенных на питательном агаре и в бульоне // Внехромосомные генетические элементы: значение для науки и практики: 6-е рабочего совещание по программе «Плаزمиды». Тезисы докладов. — М., 1981. — С. 50–51.
13. *Дедков В.С., Дегтярев С.Х.* Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов *Streptomyces* и *Nocardia* // *Прикл. биохимия и микробиология.* — 1992. — Т. 28. — С. 309–313.
14. *Дедков В.С.* Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // *Биотехнология.* — 2004. — № 4. — С. 77–82.
15. *Зернов Ю.П. и др.* Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолabileйной щелочной фосфатазы // *Биотехнология.* — 2005. — № 6. — С. 3–11.
16. *Roberts R. J. et al.* A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1805–1812.
17. *New England Biolabs Catalog. 2005–2006.* New England Biolabs, Inc 32 Tozer Road Beverly, MA 01915-5599, USA. P. 12.
18. *Chambers S. et al.* The pMTL nic- cloning vectors. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing // *Gene.* — 1988. — Vol. 68. — P. 139–149.
19. *Yanish-Perron C. et al.* Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 // *Gene.* — 1985. — Vol. 33. — P. 103–119.

Список сокращений

BSA — бычий сывороточный альбумин,
 RMSF — фенилметилсульфонилфторид,
 ДТТ — дитиотреитол,
 ПЦР — полимеразная цепная реакция,
 РМ система — система рестрикции-модификации.
 Трис — (оксиметил) аминометан,
 ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота,
 ЭР — эндонуклеаза рестрикции, рестриктаза.

NEW SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE BspACI FROM BACILLUS PSYCHRODURANS AC RECOGNIZES 5'-C ↓ CGC-3'/5'-G ↑ CGG-3'

M.V. TARASOVA^{1,2}, Z.K. DJANOBILOVA¹, Yu.E. TOMILOVA¹, V.S. DEDKOV¹,
V.A. CHERNUKHIN¹, S.Kh. DEGTYAREV¹

¹*SibEnzyme Ltd,*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk*

A novel site-specific endonuclease BspACI from the bacterial strain *Bacillus psychrodurans* AC has been characterized. This enzyme is an isoshizomer of restriction endonuclease AciI and cleaves DNA sequences 5'-C ↓ CGC-3'/5'-G ↑ CGG-3', producing two nucleotides 3'-sticky ends. The investigation of hydrolysis dependence of 5-methylcytosines presence in BspACI recognition sequence using methylated oligonucleotides was carried out. Nickase activity of BspACI for DNA sequences 5'-CCG(m5C)-3'/3'-GGCG-5' was shown.

Keywords: restriction endonuclease, DNA methylation.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ФЛАВИВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

О.В. МОРОЗОВА^{1*}, В.Н. БАХВАЛОВА², Е.И. ИСАЕВА³, В.В. ПАНОВ², Л.Э. МАТВЕЕВ¹,
Е.В. ПРОТОПОПОВА⁴, STEPHEN SELIGMAN⁵

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН;

² Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск;

³ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва;

⁴ ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
п. Кольцово, Новосибирская область;

⁵ New York Medical College, Valhalla, NY, USA

Флавивирuсы, переносимые клещами, распространены в природных популяциях членистоногих и позвоночных резервуарных хозяев и представляют опасность для здоровья и жизни населения эндемичных территорий России. Для оценки и прогнозирования эпидемиологической опасности природных очагов необходима разработка новых методов детекции флавивирuсов с высокой чувствительностью и специфичностью. Применение методов молекулярной биологии (обратной транскрипции – ОТ) с последующей двухраундовой ПЦР с праймерами, соответствующими генам E и NS3, а также 3'-нетранслируемой области вирусного генома, и иммуноферментного анализа с иммобилизованными моноклональными антителами против белка E и вторыми антителами, направленными против белков вируса клещевого энцефалита и конъюгированными с пероксидазой хрена или со щелочной фосфатазой) в 2006–2008 гг. на территории Новосибирской области позволило выявить вирусную инфекцию у 6–12% имаго таежного клеща и в 6–39% образцов органов диких мелких млекопитающих по данным ИФА и в 15–57% – по данным ОТ-двухраундовой ПЦР. Оценка вирусной нагрузки с использованием обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени с праймерами и TaqMan зондом, специфичными для гена NS1 ВКЭ, показала присутствие приблизительно 10^4 – 10^7 геном-эквивалентов в отдельном клеще и 10^3 – 10^5 копий генома в мозгу мелких млекопитающих. Для детекции антител, специфичных для разных видов флавивирuсов, могут применяться множественные антигенные пептиды, содержащие консервативный пептид слияния флавивирuсов.

Ключевые слова: флавивирuсы, вирус клещевого энцефалита, паразитарная система, клещи-переносчики, мелкие млекопитающие, обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, множественные антигенные пептиды, пептид слияния флавивирuсов.

Введение

В природных популяциях на территории России среди РНК-содержащих флавивирuсов, переносимых клещами, доминирует вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), но также обнаружены вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ), вирус Западного Нила (ВЗН) и вирус Повассан (ВП). Попадая в организм человека

при укусах клещей, эти вирусы способны вызывать тяжелые заболевания, нередко с инвалидизирующими или смертельными последствиями. В течение последних 70 лет не прекращаются исследования, направленные на разработку и усовершенствование методов индикации флавивирuсных инфекций. В настоящее время для этого используют вирусологические, серологические и иммуноферментные подходы, а также методы обнаружения вирусных геномных РНК, включающие прямую и обратную молекулярную гибридизацию нуклеиновых кислот (МГНК), обратную транскрипцию (ОТ) в сочетании с однораундовой или двухраундовой ПЦР с детекцией продуктов реакций посредством электрофореза или с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени [1]. В большинстве стран

* Автор для переписки:

© 2009 г., Морозова Ольга Владимировна,
д.б.н., сотрудник Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
Тел. (383)336-09-89
Факс: (383)333-36-77
E-mail: mov@niboch.nsc.ru

для определения флавивирусов и, в частности, ВКЭ применяют только иммуноферментный анализ (ИФА) с ограниченной чувствительностью и специфичностью [2]. Поэтому для универсального подхода к мониторингу и статистике недавно была создана Европейская Сеть для Диагностики Импортированных Вирусных Заболеваний (European Network for Diagnostics of «Imported» Viral Diseases (ENIVD)), позволяющая выявлять вирусные инфекции с применением единых систем детекции и сравнивать эпидемиологические данные из разных эндемичных регионов Евразии [2].

Для РНК-содержащих флавивирусов, циркулирующих в природных популяциях на территории России, характерны генетическая изменчивость и вариабельность вирусных белков, что затрудняет создание универсальных диагностических систем.

Одним из наиболее консервативных фрагментов белка оболочки вирионов Е является «пептид слияния» (98–113 а.о.), ответственный за проникновение флавивирусов в клетки [3]. Поверхность вирионов флавивирусов образована 90 димерами гликопротеина Е. Рентгеноструктурный анализ гликопротеина Е выявил наличие 3 доменов I, II и III, а также наличие «сd» петли на вершине домена II, которая и представляет собой пептид слияния.

В зрелых вирионах часть пептида слияния одного из мономеров находится под доменами I и III соседнего мономера и таким образом экранирована от связывания с антителами к белку Е. После рецептор-опосредованного проникновения флавивирусов в эндосомы клетки хозяина происходит высвобождение частично скрытого пептида слияния и мономеры белка Е образуют тримеры [для обзора см. 3]. Поверхностная локализация и высокая консервативность пептида слияния среди флавивирусов, переносимых клещами, обуславливают его перспективность для разработки новых методов детекции флавивирусных инфекций.

Цель данной работы состояла в разработке и апробации молекулярных методов детекции флавивирусов на основе ПЦР и иммуноферментного анализа с синтетическими пептидами, содержащими консервативный пептид слияния флавивирусов.

Методы

Сбор клещей. Голодных имаго таежного клеща собирали с растительности в природном очаге клещевого энцефалита на территории Новосибирской области в эпидемиологические сезоны 2006–2008 гг.

Отлов мелких млекопитающих проводили там же в период всех сезонов 2006–2008 гг. Методы отлова описаны ранее [4].

Биопробу проводили посредством внутримозгового и подкожного заражения лабораторных мышей ICR массой тела 6–8 г гомогенатами клещей и органов животных (головной мозг и селезенка). Штаммы вируса, выявленные по заболеванию мышей, идентифицировали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), реакции биологической нейтрализации (РН) [5], ИФА и ОТ-ПЦР, как описано ранее [4].

ОТ-ПЦР осуществляли в соответствии с [4, 6–7].

ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени проводили с праймерами и зондами, соответствующими гену NS1, как описано ранее [1].

Имуноферментный анализ выполняли в соответствии с [4]. Кроме того, определение гликопротеина Е проводили посредством твердофазного ИФА с применением тест-систем «ВектоВКЭ-антиген-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, www.vector-best.ru). Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре «Мультискан» при длине волны 450 нм.

Пептиды FA4T5 DRGWGNHCGLFGKGSIFT-SLGKAVNHQVFKK (98–113 а.о. белка Е ВКЭ, FT, 431–440 а.о. белка Е вируса Дэнге 4, VKK) и FA4T4 DRGWGNHCGLFGKGSIGITVNPVTEKDSPV NIEKK (98–113 а.о. белка Е ВКЭ, G, 352–368 а.о. белка Е вируса Дэнге 2, KK) были синтезированы в Keck Biotechnology Resource Center (New Haven, США) и присоединены к трипептиду, состоящему из остатков лизина, как тетравалентные множественные антигенные пептиды (МАП). Биотинилированный линейный пептид BFA biotin-TYSDRGWHNGCGLFGKGSИ был синтезирован там же. Пептиды растворяли в стерильной деионизированной воде до концентрации 50 мг/мл и хранили при -20 °С. МАП и биотинилированный линейный пептид BFA в концентрациях 5 и 10 мкг/мл в 0,1хPBS сорбировали на планшеты Costar, а также на нитроцеллюлозные, нейлоновые и PVDF (polyvinylidene fluoride) фильтры с различным диаметром пор при комнатной температуре в течение ночи. Поликлональные и моноклональные антитела мыши к белку Е ВКЭ или ВЗН, в различных разведениях в буфере для разведения сывороток инкубировали с иммобилизованными синтетическими пептидами в течение 2–18 ч при комнатной температуре. Иммунные комплексы выявляли при помощи антител кролика против иммуноглобулинов мыши и конъюгированных с пероксидазой хрена (ЗАО

«БиоСан», г. Новосибирск) в разведении 1:10000; планшеты окрашивали ортофенилендиамином, а фильтры — 4-хлор-1-нафтолом с перекисью водорода. Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре «Униплан» (производства «Pison Inc», г. Москва) при длине волны 492 нм.

Результаты

Для изучения природных очагов флавивирусных инфекций были разработаны и апробированы в 2006–2008 гг. новые молекулярно-биологические методы детекции вирусной геномной РНК и белка оболочки вирионов. Для оценки эпидемиологической опасности природного очага клещевого энцефалита (КЭ) на территории Новосибирской области проводили системный анализ вирусоносительства у иксодовых клещей — переносчиков ВКЭ и мелких млекопитающих, которые служат прокормителями личинок и нимф клещей, а также резервуарными хозяевами ВКЭ. Исследования осуществляли посредством традиционного вирусологического метода биопробы на мышах, ОТ-ПЦР с различными праймерами и способами детекции продуктов реакции, а также ИФА с применением тест-системы «ВектоВКЭ-антиген-стрип».

Наиболее чувствительным и специфичным методом детекции считается ОТ-ПЦР, что дает возможность выявлять десятки геном-эквивалентов в реакционной смеси. ИФА с применением тест-системы «ВектоВКЭ-антиген-стрип» также обладает высокой чувствительностью, предел которой составляет приблизительно 0,5 нг/мл для гликопротеина Е и в несколько раз больше для рекомбинантного белка Е [1]. По данным наших исследований, наборы «ВектоВКЭ-антиген-стрип» позволяют выявлять не только различные типы ВКЭ, но и близкородственный, переносимый клещами флавивирус ОГЛ, ареал которого перекрывается с ареалом ВКЭ на некоторых эндемичных территориях, в частности, в Новосибирской области.

Частоты детекции ВКЭ в природных популяциях клещей (рис. 1) и теплокровных хозяев (рис. 2) в Новосибирской области, определяемые посредством молекулярно-биологических методов (ОТ-ПЦР и ИФА), оказались выше показателей, определяемых посредством внутримозгового заражения мышей-сосунков. Выделение патогенного для лабораторных мышей ВКЭ из органов диких мелких млекопитающих обычно удается лишь в единичных случаях, в то время как субвирионные компоненты выявляются значительно чаще [4].

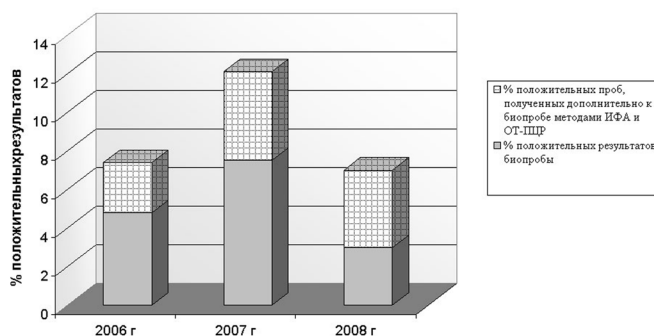


Рис. 1. Сравнение результатов детекции ВКЭ методами биопробы на мышах, ИФА и ОТ-ПЦР в суспензиях клещей *Ixodes persulcatus*, собранных на территории Новосибирской области в 2006–2008 гг. Серые столбцы соответствуют доле (в %) клещевых суспензий, положительных по результатам биопробы на мышах, относительно общего количества исследованных образцов. Заштрихованные верхние части столбцов соответствуют доле положительных проб, полученных дополнительно к данным биопробы методами ИФА и ОТ-ПЦР

На рисунке 2 приведены усредненные за 2006–2008 гг. результаты определения РНК и гликопротеина Е ВКЭ в образцах головного мозга 216 мелких млекопитающих трех видов, доминирующих на территории Новосибирской области.

Оценку вирусной нагрузки в клещах и органах мелких грызунов проводили методом ОТ с последующей ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени с TaqMan зондом. Пороговые циклы (Ct) в исследованных клещевых суспензиях варьировали в диапазоне от

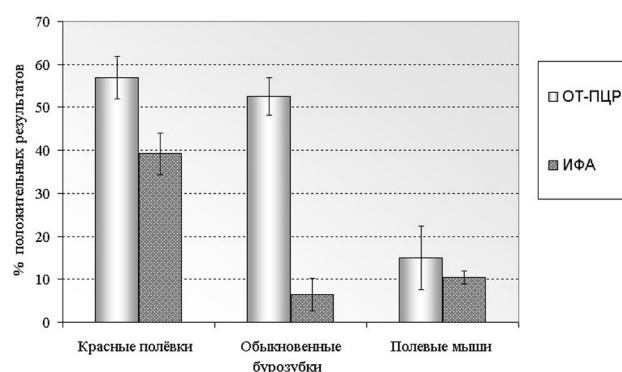


Рис. 2. Частота детекции РНК ВКЭ (методом ОТ-двухраундовой ПЦР) и белка Е ВКЭ (посредством иммуноферментного анализа) в головном мозге мелких млекопитающих в природном очаге Новосибирской области

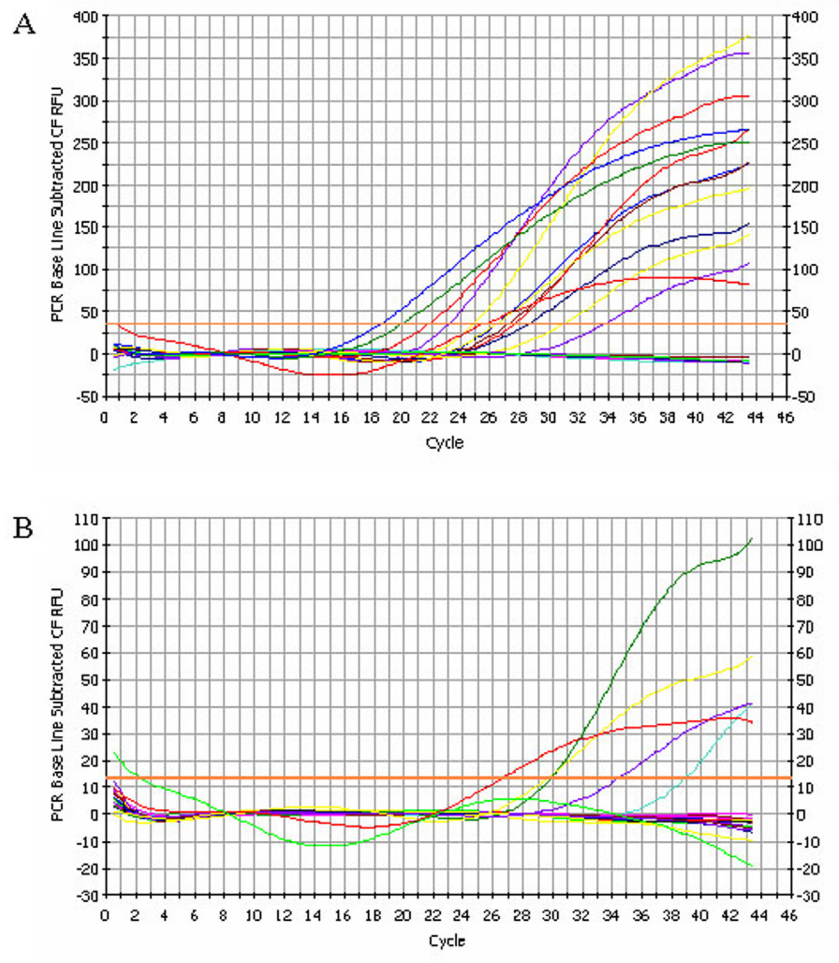


Рис. 3. Количественные оценки вирусной нагрузки в резервуарных хозяевах методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

А – пробы РНК от клещей

Пороговые циклы $C_t=21-33$ соответствуют 10^4-10^7 геном-эквивалентов у отдельного клеща.

В – пробы РНК от мелких млекопитающих.

Пороговые циклы $C_t=29-50$ соответствуют 10^2-10^5 в мозгу или селезенке красных полевок.

Примечание: Рисунки включают кривые флуоресценции для калибровочных проб с известным количеством геном-эквивалентов ВКЭ (плазмидной ДНК рBR322-TBEVS* с клонированной полноразмерной ДНК-копией генома ВКЭ) в соответствующем диапазоне

21 до 33, которые с учетом эффективности выделения РНК и ревертирования (около 50%) приблизительно соответствовали 10^4-10^7 геном-эквивалентов у отдельного клеща (рис. 3А). Для теплокровных резервуарных хозяев пороговые циклы в диапазоне от 29 до 50 соответствовали 1–1000 копий в реакционной смеси или около 10^3-10^5 в мозгу (рис.3В).

Анализ вариабельности белков флавивирусов показал, что одним из наиболее консервативных участков белков, расположенных на поверхности вирионов, является пептид слияния (fusion peptide). Так, среди 280 структур, депонированных в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), обнаружен единственный

мутантный вариант ВКЭ с единственной аминокислотной заменой в пептиде слияния и одно отличие в пептиде слияния у переносимого клещами вируса Киасанурской лесной болезни. Исключение составляют флавивирусы Повассан и вирус оленей, распространенные в Северной Америке и переносимые клещами *Ixodes scapularis*, для которых характерен другой вариант пептида слияния с аминокислотным остатком фенилаланина в позиции 107 белка Е [3].

С учетом данных о структуре «пептида слияния» были синтезированы тетравалентные множественные антигенные пептиды, содержащие пептиды слияния, присоединенные к трипептиду из остатков лизина. Показана

возможность сорбции МАП на полистирольные планшеты, а также на нитроцеллюлозные (НЦ), капроновые (К) и поливинилиденфторидные (Polyvinylidene Fluoride (PVDF)) фильтры. Оптимальным буфером для сорбции МАП и линейного пептида слияния являлся 0,1хPBS, в то время как в бикарбонатном буфере эффективная иммобилизация синтетических пептидов на полистирольные планшеты не происходила. Показано, что оптимальной концентрацией является 5 мкг/мл для различных мультипептидных антигенов и линейных пептидов. ИФА с применением этих синтетических пептидов в качестве антигенов позволил выявлять поликлональные и моноклональные антитела мыши к белку Е ВКЭ и ВЗН с титрами от 1:6400 до 1:1:500000. Конъюгаты на основе антител кролика, специфичных к иммуноглобулинам мыши, давали возможность обнаруживать антитела из сывороток не только лабораторных мышей *Mus musculus*, но и диких грызунов — полевых мышей *Apodemus agrarius* и красных полевок *Myodes rutilus Pallas*.

Обсуждение

Поскольку паразитарная система КЭ включает в себя беспозвоночных и позвоночных, для адекватной оценки эпидемической опасности очагов необходим комплексный анализ зараженности хозяев ВКЭ (клещей и млекопитающих) с оценкой индивидуальной вирусной нагрузки и определением генетического типа ВКЭ в зависимости от их популяционной динамики. Мониторинг паразитарной системы КЭ и анализ заболеваемости населения КЭ на территории Новосибирской области с 1980 г. по настоящее время показал периодическую изменчивость не только численности и вирусфорности хозяев ВКЭ, но и показателей заболеваемости людей [8]. Заболеваемость людей клещевым энцефалитом повсеместно подвержена цикличности со значительными периодическими подъемами один раз в 10–12 лет и небольшими пиками каждые 3–4 года [9]. Максимальная заболеваемость населения на эндемичных по клещевому энцефалиту территориях отмечается 1–2 года, затем в течение 1–5 лет следует период спада заболеваемости с последующей стабилизацией на минимальном уровне, продолжающемся 6–7 лет, и новым подъемом до максимального уровня [10]. Цикличность изменений характерна не только для общего уровня заболеваемости, но и для соотношения клинических форм [10]. При этом параметры, традиционно используемые для оценки эпидемической активности природных очагов клещевого энцефалита — обилие основных переносчиков

(иксодовых клещей) и частота их зараженности ВКЭ, — не коррелируют с уровнем заболеваемости людей для различных эндемичных территорий, в частности, для Новосибирской области [8], Томской области, Республики Беларусь [10] и Приморского края [11].

Численность и иммунная реактивность мелких млекопитающих, интенсивность их участия в прокормлении клещей и циркуляции ВКЭ также периодически изменялись на протяжении популяционных циклов. При этом периоды спада численности мелких млекопитающих, сопровождающиеся снижением неспецифической иммунной реактивности, ростом их пораженности личинками и нимфами клещей и увеличением доли особей с антителами, ингибирующими гемагглютинацию, предшествовали (на 1–2 года) периодам максимальных уровней заболеваемости. Временной интервал 1–2 года соответствует срокам развития личинок и нимф клещей в имаго, которые преимущественно и переносят ВКЭ человеку. Положительная зависимость между заболеваемостью людей клещевым энцефалитом и серопозитивностью мелких млекопитающих выявлена и в природных очагах Западного Саяна [12]. Возможно, положительная зависимость между заболеваемостью людей и интенсивностью эпизоотического процесса КЭ среди млекопитающих характерна для многих природных очагов КЭ. Одной из причин может быть изменчивость природной популяции ВКЭ, связанная с активацией персистирующих вариантов ВКЭ в организме диких млекопитающих вследствие ослабления их иммунного статуса по ходу популяционных циклов.

Необходимо отметить, что диапазон вирусной нагрузки у отдельных клещей превышал количества геном-эквивалентов ВКЭ в органах млекопитающих, что могло быть обусловлено отличиями механизмов репликации ВКЭ в клетках беспозвоночных и позвоночных и/или факторами неспецифической резистентности и иммунитетом.

Кроме известной генетической variability РНК-содержащих флавивирусов, обнаружены отличия генетических типов ВКЭ, выделенных из беспозвоночных и позвоночных хозяев. Среди инфицированных таежных клещей на территории Новосибирской области выявляются только штаммы, относящиеся к сибирскому генетическому типу, а в органах мелких грызунов обнаружены изоляты дальневосточного и сибирского типов [4, 6–7]. Наблюдаемые отличия в распределении генетических типов ВКЭ между позвоночными и беспозвоночными резервуарными хозяевами могут быть следствиями длительной адаптации или селекции.

В результате лабораторной адаптации ВКЭ к клещам показаны генотипические и фенотипические изменения [13]. Всего 15 точечных мутаций приводили к замедлению репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих и увеличению репликации в клещах, к пониженной нейроинвазивности для мышей и отсутствию гемагглютинирующей активности. При этом для любого клонального изолята ВКЭ сохранялось генетическое и фенотипическое разнообразие [13]. Возможно, аналогичные перестройки квазивида происходят и при циркуляции ВКЭ в природных популяциях и определяются закономерностями популяционной динамики резервуарных хозяев.

Применение современных методов детекции и идентификации переносимых клещами флавивирусов позволит повысить информативность мониторинга природных очагов, понять закономерности динамики сопряженных паразитарных систем и оценить эпидемическую опасность на эндемичных территориях.

Заключение

1. Разработка и применение молекулярно-биологических методов детекции флавивирусов посредством ОТ-ПЦР и ИФА позволили выявить латентные и персистирующие формы инфекции и показать, что частоты вирусносительства ВКЭ в природных популяциях клещей и теплокровных хозяев в Новосибирской области значительно выше показателей, определяемых посредством внутримозгового заражения мышечных сосунков.
2. Оценка вирусной нагрузки посредством ОТ-ПЦР в режиме реального времени показала, что количества вирусных геном-эквивалентов у клещей больше, чем в органах мелких млекопитающих.
3. Множественные антигенные пептиды, содержащие пептид слияния белка Е флавивирусов, при прямой иммобилизации на полистирольные планшеты и нитроцеллюлозные, капроновые и поливинилиденфторидные (PVDF) фильтры позволяют выявлять специфичные для флавивирусов антитела грызунов.

Литература

1. Морозова О.В., Бахвалова В.Н., Панов В.В. Сравнение методов детекции вируса клещевого энцефалита / В кн.: *Фундаментальные науки — медицине*. — Новосибирск: Арта, 2008. — С. 171–177.
2. Mantke O.D., Schaedler R., Niedrig M. 2008 a survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries //

Eurosurveillance. — Vol. 13(17). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18916>

3. Seligman S.J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide // *Virology*. — 2008. — Vol. 5. — P. 27–37.
4. Bakhvalova V.N., Dobrotvorsky A.K., Panov V.V., Matveeva V.A. et al. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia // *Vector Borne Zoonotic Dis.* — 2006. — Vol. 6(1). — P. 32–41.
5. Дерябин П.Г., Лебедева Г.А., Логинова Н.В. Реакция нейтрализации тогавирусов на мышцах и культурах клеток / В кн.: *Арбовирусы: методы лабораторных и полевых исследований*. — М.: Наука, 1986. — С. 120–126.
6. Morozova O.V., Dobrotvorsky A.K., Livanova N.N., Tkachev S.E. et al. PCR Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus and human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 3802–3804.
7. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Morozov I.V. Heterogeneity of 3'-untranslated region of genome RNA of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains isolated from ticks in the Western Siberia, Russia // *International J. of Biomed. Science.* — 2007. — Vol. 3(3). — P. 206–209.
8. Добротворский А.К., Бахвалова В.Н., Харитоновна Н.Н., Сапегина В.Ф. Динамика параметров паразитарной системы клещевого энцефалита в условиях северной лесостепи Приобья // *Сиб. экол. журнал*. — 1994. — Т. 1(4). — С. 369–375.
9. Злобин В.И. Эпидемиологическая обстановка и проблемы борьбы с клещевым энцефалитом в Российской Федерации // *Бюллетень Сибирской медицины*. — 2006. — Т. 5. — Приложение № 1. — С. 16–23.
10. Команденко Н.И., Жукова Н.Г. Некоторые дискуссионные вопросы проблемы клещевого энцефалита // *Бюллетень Сибирской медицины*. — 2006. — Т. 5. — Приложение № 1. — С. 57–62.
11. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. Основные черты эко-эпидемиологии клещевого энцефалита ISSN журнала 1609-9877, сайт www.infectology.spb.ru, 2005.
12. Гутова В.П., Наумов Р.А. Оценка возможности использования параметров паразитарной системы для прогноза заболеваемости клещевым энцефалитом / В кн.: *Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики клещевого энцефалита*. Тез. докл. Всесоюз. симп. (18–21 сентября 1990 г.). — Иркутск, 1990. — С. 66–67.
13. Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivanian T.I., Bakhmutov D.V., Lukashov A.N., Gmyl L.V., Rumyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation // *Virology*. — 2007. — Vol. 362. — P. 75–84.

DEVELOPMENT OF NEW APPROACHES TO EVALUATION OF THE EPIDEMIOLOGIC RISK OF THE FLAVIVIRUS INFECTIONS ENDEMIC REGIONS

O.V. MOROZOVA¹, V.N. BAKHVALOVA², E.I. ISAEVA³, V.V. PANOV², L.E. MATVEEV¹,
E.V. PROTOPOPOV⁴, STEPHEN SELIGMAN⁵

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch RAS, Novosibirsk, mov@niboch.nsc.ru;

² Institute of Systematics and Animals Ecology SB RAS, Novosibirsk, bvntbe@yandex.ru;

³ D.I. Ivanovsky Institute of Virology. RAMS, Moscow, immunol.lab@mail.ru;

⁴ Federal State Institution of Science – National Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia, eprotopopova@ngs.ru;

⁵ New York Medical College, Valhalla, NY, USA, stephen_seligman@nymc.edu

Tick-borne flaviviruses are widely spread in natural populations of arthropods and vertebrate reservoir hosts and cause life-threatening diseases among people in endemic regions of Russia. For estimation and possible prognosis of epidemiological risk in endemic regions new detection methods of flaviviruses with high sensitivity and specificity must be designed and developed. Our elaboration and implementation of new methods using reverse transcription (RT) with subsequent nested PCR with primers corresponding to genes E and NS3, as well as 3'-untranslated region, real time PCR with TaqMan probe from NS1 gene and ELISA with immobilized monoclonal antibodies against glycoprotein E and second antibodies against tick-borne encephalitis virus in conjunction with horseradish peroxidase or alkaline phosphatase allowed us to reseat in 2006–2008 in Novosibirsk region tick-borne encephalitis virus in 6–12% of adult ticks and in 6–39% of samples from organs of wild small mammals by means of ELISA and in 15–57% by using RT-nested PCR. Estimation of the virus load using real time RT-PCR with primers and TaqMan probe specific for the TBEV NS1 gene, revealed presence of approximately 10^4 – 10^7 genome-equivalents in individual tick and 10^3 – 10^5 copies of RNA genome in brain samples from small mammals. To detect antibodies against different flavivirus species, multiple antigenic peptides (MAP) including flavivirus-specific fusion peptide, can be used.

Keywords: flaviviruses, tick-borne encephalitis virus, parasitary system, ticks-vectors, small mammals, real time RT-PCR, ELISA, multiple antigenic peptides (MAP), fusion peptide of tick-borne flaviviruses.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ОЧИЩЕНИЯ ВОДЫ

О.Г. НИКИТИНА*

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Самоочищение воды — фундаментальное свойство любой воды. Это — естественный процесс, зависящий от множества факторов. На природных водных объектах процесс самоочищения протекает очень медленно. Поэтому исследователи обращаются к ускоренному аналогу самоочищения — биологической очистке сточных вод в аэротенках, где тот же процесс ускорен в десятки тысяч и даже в сотни тысяч раз. Аэротенк представляет собой биореактор, или биотехнологическую экосистему, в которой техническими средствами создаются максимально комфортные условия для процветания органотрофных бактерий, составляющих основную массу активного ила, очищающего сточную воду.

Работая на очистных сооружениях, мы обратили внимание на то, что традиционно считающиеся важными такие факторы, как рН, количество растворенного кислорода и температура, изменяющиеся в тех пределах, какие возможны на городских очистных сооружениях, не влияют на изменение качества очищенных сточных вод. Заведомо нарушающими факторами были сбои в работе технологического оборудования, снижение концентрации активного ила и воздействия определенных промстоков.

Акцент был сделан на периоды между этими заведомо нарушающими воздействиями, изменениями в активном иле и последующим снижением качества очищенной воды. В экосистеме станции аэрации промежутки между нарушающим воздействием и его последствием сокращаются до нескольких суток. Необходимо было проанализировать изменения сообщества активного ила, выбрать показательные организмы, которые изменением своей численности сигнализировали бы о конкретных нарушающих воздействиях. Собранный за многие годы материал был подвергнут статистическому анализу. В несколько этапов был создан цифровой гидробиологический метод контроля процесса очистки сточных вод,

в который восстановительные рекомендации вошли как неотъемлемая составная часть (Носов В.Н. и др., 1981, 1983; Никитина О.Г. и др., 1987; Никитина О.Г., Кагарманов А.Ф., 2003).

Для наименования нового метода был вначале выбран старый термин — биоиндикация. Однако в последующем был предложен термин «биоэстимация». Этот метод позволяет решать проблемы очистки сточных вод, которые ранее практически не решались, а именно: проблемы, связанные с вспуханием, вспениванием, всплыванием активного ила и с измельчением его агрегатов (флоккул, хлопьев), а также с минимизацией избыточного активного ила.

Новый метод был достаточно апробирован. Он стал предметом теоретических и практических занятий по спецкурсу «Биотехнология очистки сточных вод» для студентов и слушателей курсов повышения квалификации.

Поскольку процесс биологической очистки сточных вод и процесс биотического самоочищения природной воды различаются только по скорости протекания, а по существу — тождественны, то в дальнейшем для обозначения этого процесса мы будем использовать термин «очищение воды». Тем более что самоочищение оказывается все более редким случаем в дикой природе и почти сошло на нет в местах интенсивного водопользования. Службы мониторинга повсеместно бьют тревогу по поводу низкого качества воды и призывают к усилению охраны водных объектов. Но в настоящее время целесообразно от охранных мероприятий переходить к охранно-восстановительным (Никитин Е.Д. и др., 2006). Здесь оказывает существенную помощь биоэстимация — новый метод диагностики, прогнозирования и регулирования процесса очищения воды в любом водном объекте, будь-то аэротенк, пруд, канал, колодец, аквариум, озеро, участок реки или моря (Никитина О.Г. и др., 2005).

В таблице 1 обобщена сущность биоэстимации процесса очищения загрязненной воды в природных и искусственных водных объектах. В столбце 1 перечислены главные, наиболее значимые группы факторов воз-

* Автор для переписки:

© 2009 г. Никитина О.Г.

Докторант кафедры общей экологии биофака
МГУ им. М.В. Ломоносова

Обобщенная характеристика биоэстимации для водных объектов

Группы факторов	Факторы	Биоэстиматоры	Пороговые численности млн./ г	Восстановительные рекомендации
1	2	3	4	5
I. Обеспечение подвижности среды	I-1. Рециркуляция активного ила	Б-1. Жгутиковые	3,5	Поиск и ликвидация зон застоя и загнивания ила, увеличение проточности
	I-2. Макротурбулентность	Б-2. Амебоиды	2,9	Увеличение бокового притока и оттока
	I-3. Микротурбулентность	Отношение численности свободно плавающих инфузорий Б-3 к численности прикрепленных Б-4	1,0	Увеличение шероховатости дна и/или использование технических средств
II. Нагрузка	II-1. Легко окисляемые вещества	Б-5. Хламидобактерии и актиномицеты	15,0	Создание дополнительных убежищ для деструкторов
	II-2. Трудно окисляемые вещества	Б-6. Раковинные амебы и сидеротеки	4,7	Ограничение поступления гумуса извне
III. Воздействие промстоков	III-1. Сахара	Б-7. Зернистые флоккулы бактерий	2,9	Выявление предприятий-нарушителей, модернизация и/или строительство локальных очистных сооружений на предприятиях, сбрасывающих соответствующие загрязнения
	III-2. Токсиканты	Б-8. Гифомицеты	2,9	
	III-3. Спирты	Б-9. Цианобактерии	1,5	
	III-4. Жиры, нефтепродукты	Б-10. Планктонные раковинные саркодовые	4,7	

действия на процесс биотрансформации органических веществ в очищаемой воде:

1. Обеспечение подвижности среды, или динамическое обеспечение процесса очищения воды, или обеспечение своевременной поставки пищи микроорганизмам-деструкторам и отведение образующихся метаболитов. Для этого водная среда должна двигаться, то есть необходима проточность, общее перемешивание (макротурбулентность потока) и промешивание водной среды в микрizonaх (микротурбулентность потока). Под макротурбулентностью понимаются плавные перемещения водной массы поперек основного потока, что, как правило, бывает обеспечено в любом водоеме за счет рельефа, миандрирования, конвекции и др. Мы редко встречали водные объекты, в которых этот параметр не был бы обеспечен. Хуже обстоит дело с микротурбулентностью, под которой понимается перемешивание

воды в микрizonaх, в которых и происходит основная «работа» микроорганизмов по трансформации органических веществ. В большинстве обследованных водных объектов этот параметр не обеспечен в надлежащей мере. Поэтому нами разработаны восстановительные рекомендации при любых выявляемых нарушениях процесса очищения воды.

2. Нагрузка — это количество всех перерабатываемых, загрязняющих воду веществ, приходящееся на всех деструкторов этих загрязнений в единицу времени. Измерить этот показатель в настоящее время не представляется возможным, так как не известна величина числителя (БПК, служащее обычно основой всех традиционных расчетов, отображает менее 10% всех реально перерабатываемых загрязнений). Однако биоэстимация позволяет ответить на вопросы, нормальна нагрузка или она превышена, по легко окисляемым веществам она

превышена или по трудно окисляемым, и рекомендовать соответствующие мероприятия.

3. Воздействие промстоков — это нарушение процесса самоочищения, вызванное попаданием в водные объекты веществ, не характерных для него, принесенных промстоками или смывами с берегов в результате хозяйственной деятельности человека. Обычно их называют антропогенными загрязнениями. Однако аналогичные вещества могут попасть в воду и в результате природных катаклизмов. Биоэстимация помогает выявить эти воздействия и даже классифицировать их, разделив на 4 наиболее распространенные группы.

В столбце 2 таблицы 1 перечислены основные факторы, входящие в соответствующую группу. В столбце 3 приведены номера биоэстиматоров и их биологическая расшифровка. В столбце 4 даны пороговые численности, выраженные в миллионах соответствующих биоэстиматоров на 1 г взвешенных веществ в данной пробе воды (млн./г). Биоэстимационное значение является только при условии превышения пороговых численностей; простое обнаружение этих организмов не является тревожной информацией. В столбце 5 приведены типовые восстановительные рекомендации, на основе которых разрабатываются на месте восстановительные мероприятия для каждого конкретного водного объекта или его участка.

Закономерность, согласно которой благополучие редуцентов органических веществ зависит от воздействия именно этих трех основных групп факторов, оказалась справедливой не только для любого водного объекта, но и для других экосистем, существенной составляющей которых является жидкая фаза, например, для почв и почвенной влаги (Никитина О.Г., Никитин Е.Д., 2007).

Имеется также материал, который позволяет сделать вывод о применимости биоэстимации в фитопатологии.

В заключение следует подчеркнуть важность понимания единой сущности процесса биотического очищения воды в любом водном объекте и закономерности, согласно которым оптимизация этого процесса обеспечивается

благодаря учету трех основных групп факторов: динамики среды, нагрузки и специфических воздействий. Новый метод контроля процесса очищения воды — биоэстимация — может быть адаптирован для контроля и оптимизации различных биореакторов.

Литература

1. Носов В.Н., Никитина О.Г., Максимов В.Н. Некоторые особенности изменения биологической структуры активного ила // Биол. науки. — 1981. — № 6. — С. 84–87.
2. Носов В.Н., Никитина О.Г., Максимов В.Н. Построение системы биоиндикации процесса очистки сточных вод // Вестник Московского университета. Серия Биология. — 1983. — № 4. — С. 60–68.
3. Никитина О.Г., Догадаева О.С., Носов В.Н., Максимов В.Н. Способ контроля процесса очистки сточных вод с активным илом. Авторское свидетельство № 1343746, зарегистрированное 8.06.87 г. в Государственном реестре изобретений СССР.
4. Никитина О.Г., Кагарманов А.Ф. Новая концепция биологической очистки сточных вод и примеры ее реализации. — М., 2003. — 30 с.
5. Никитина О.Г., Максимов В.Н., Никитин Е.Д., Никитин Н.Е. Новое направление в исследовании акваэкосистем / В кн.: Теоретические проблемы экологии и эволюции. (Четвертые Люблинские чтения). Тольятти, 2005. — С. 159–168.
6. Никитин Е.Д., Шоба С.А., Кочергин А.Н., Никитина О.Г., Никитин Н.Е., Сабодина Е.П., Мякокина О.В. Функциональный биосферно-ноосферный подход при создании Комплексной красной книги биологических, почвенных, водных и др. объектов / В кн.: Почва как связующее звено функционирования природных и антропогенно-преобразованных экосистем. Материалы II Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию кафедры почвоведения ИГУ. Иркутск, 2006. — С. 12–15.
7. Никитина О.Г., Никитин Е.Д. Новый метод контроля биотрансформации растворенных органических веществ в почвенных системах / В кн.: Труды XV Всероссийской школы «Экология и почвы: Круговорот элементов в экосистемах и почвах». Пушкино, 2007. — С. 70.

BIOTECHNOLOGY OF WATER REFINING

O.G. NIKITINA

M.V. Lomonosov Moscow State University

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА В РОССИИ. СООБЩЕНИЕ 4: БИОВОДОРОД

Р.Г. ВАСИЛОВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова,
Москва

Введение

В трех номерах журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова» за 2007 год были напечатаны наши статьи о трех видах биотоплива — биодизеле, биоэтаноле, биогазе [1, 2, 3]. Эти работы вызвали интерес читателей, и были высказаны пожелания продолжить серию публикаций по данной теме.

В связи с этим в настоящей работе рассматривается вопрос о биоводороде как еще одном перспективном биотопливе. Известно, что водород в процессе сгорания не выделяет в атмосферу CO_2 , как все углеводороды. Это важно для борьбы с парниковым эффектом. Кроме того, водород обладает высокой энергоемкостью: в три раза выше, чем у нефти, на единицу массы: H_2 — 142 мегаджоуля/кг; бензин — 44.

Вопрос о биоводороде должен рассматриваться как в контексте биотоплива, так и определения его места в водородной энергетике в целом. Ныне во всем мире ежегодно производится около 50 млн. т водорода, из них: приблизительно 48% — из природного газа, 30% — из нефти, 18% — из угля (путем газификации). Имеются данные о том, что мировая потребность в водороде растет на годовую величину примерно 10% [28]. Существует прогностический расчет, согласно которому вклад водорода в общий энергетический рынок 2025 года будет 8–10% [8].

В настоящее время для получения водорода из биомассы (отходы древесины) применяется термохимический метод (температура — 500–800 °С, что гораздо ниже температуры газификации угля). При этом выде-

ляются H_2 , CO и CH_4 . Используется и электрохимический метод. Однако для электролиза требуется дешевая электроэнергия, поскольку 80% стоимости производства H_2 приходится на оплату потребления электричества.

Сейчас экономика потребляет 80% энергии из невозобновляемого сырья [15]. Тем не менее дефицит ископаемых углеводородных ресурсов и электроэнергии делает актуальным производство биоводорода из возобновляемых источников. В связи с этим получили развитие биотехнологические методы производства H_2 , включающие в себя биохимические (ферментативные) методы с использованием разных бактерий типа *Rhodobacter spheroides*, *Enterobacter cloacae* и др. и биофотолиз (получение водорода с помощью зеленых водорослей, например, *Chlamydomonas reinhardtii*). Есть подход, связанный с применением цианобактерий рода *Anabaena* [6, 27] для фотолиза.

Существенным моментом является также то, что водород можно использовать с топливными элементами для генерации электричества. По мнению специалистов, это один из перспективных путей развития биоэнергетики. Есть разработки и по MFC-технологиям (с применением «microbial fuel cells»).

Литература по биоводороду довольно обширна, пока преобладают работы теоретического и методического характера [9, 11, 14, 16, 17, 20–26, 29].

История вопроса

Биохимические способы эволюционировали с помощью перебора различных бактерий и субстратов (в условиях анаэробной ферментации в темноте и фотоферментации) и создания оптимальных технологических цепей.

Изучение водородопроизводящих водорослей прошло более сложный путь. В 1939 г. исследователь Ганс Гаффрон подметил, что зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* иногда переключается с

* Автор для переписки:

© 2009 г. Василев Раиф Гаянович
профессор, президент Общества биотехнологов России
им. Ю.А. Овчинникова
E-mail: raifvasilov@mail.ru

обычного фотосинтетического производства кислорода на продукцию водорода. Потребовались десятилетия, чтобы это эмпирическое наблюдение было истолковано. В конце 1990-х годов А. Мелис из Калифорнийского университета установил, что если из культуральной среды водорослей убрать серу, то водоросли начинают продуцировать H_2 вместо кислорода. Он также обнаружил, что ферментом, ответственным за эту реакцию, является гидрогеназа и что он теряет водородопродуцирующую функцию в присутствии кислорода. Это помогло выстроить адекватную производственную схему для получения биоводорода. В 2006 году в Германии был создан биореактор на 500–600 л культуры водорослей.

Технология

Принцип фотоиндуцированного образования биоводорода из сахаросодержащей биомассы показан на рисунке 1.

К настоящему времени главные технологические процессы производства биоводорода сводятся к трем методам:

- ферментативная продукция водорода в темноте в ацидогенной фазе анаэробного брожения;
- фотоферментация органических кислот фотоинтезирующими бактериями;
- биофотолиз воды водорослями.

Предлагается и новый подход, заключающийся в последовательном или сочетанном применении ферментации в темноте и фотоферментации.

Таким образом, биотехнологические методы получения водорода разделяются на две линии — ферментацию и фотосинтез (рис. 2).

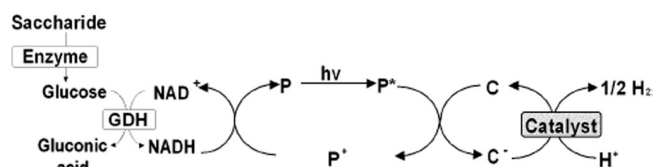


Рис. 1. Схема фотоиндуцированной продукции биоводорода из сахаридов.

Примечание: P — фотосенсибилизатор; C — электронный носитель

Имеется также возможность получения водорода из биогаза или лендфилл-газа путем риформинга.

В отношении водорослей технология выстраивается вокруг совершенствования методик, определения штаммов, способствующих продукции H_2 , и решения технических проблем конструкции биореакторов. Уже разработаны объемистые биореакторы для культивирования водорослей, которые могут оказаться экономически эффективными в промышленном производстве.

Существуют два пути производства биоводорода с помощью фотолиза: опосредованные гидрогеназой (рис. 3) и нитрогеназой (рис. 4).

Технологическая цепочка для производства биоводорода с помощью фотолиза состоит из следующих узлов (рис. 5): биореактор (1), производящий водоросли (аэробный на солнечном свете — реакция идет с выделением CO_2 и O_2); концентратор водорослей и адаптивная камера (2) (в темноте в анаэробных условиях); H_2 фотобиореактор (3) (анаэробный, на солнечном свете); газгольдер (4). Предусматривается кругооборот водорослей и нутриентов внутри технологической цепи.

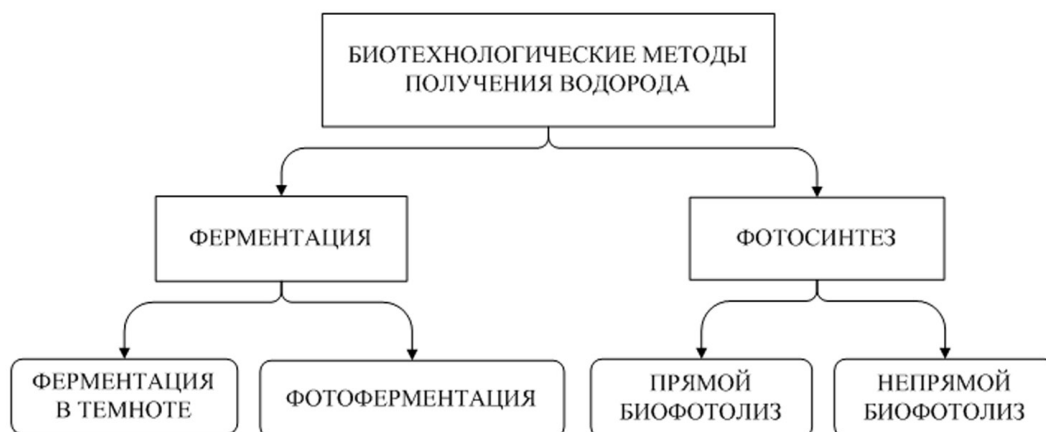


Рис. 2. Общая схема производства биоводорода

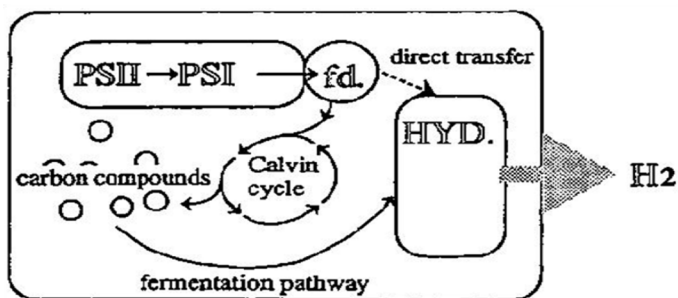


Рис. 3. Опосредованная гидрогеназой продукция H_2 .
 Источник: <http://www.authorstream.com/presentation/kumarsamvav-91816-bio-hydrogen-future-fuel-science-technology-ppt-powerpoint>

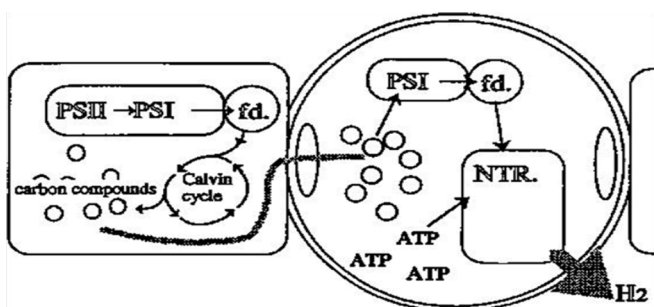


Рис. 4. Опосредованная нитрогеназой продукция H_2 .
 Источник: <http://www.authorstream.com/presentation/kumarsamvav-91816-bio-hydrogen-future-fuel-science-technology-ppt-powerpoint>

При ферментации необходимо решать проблему исходного сырья. Критерии, предъявляемые к сырью для производства биоводорода: доступность, стоимость, содержание углеводов и биodeградируемость.

Субстратами для ферментативного производства био H_2 являются: простые сахара, полисахариды (крахмал, целлюлоза), отходы пищевой промышленности и сточные воды.

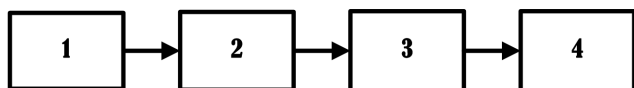


Рис. 5. Принципиальная схема технологической цепи производства биоводорода с помощью водорослей (объяснение в тексте)

Как и в любой технологии, имеющей дело с целлюлозой, требуется предварительная обработка такого сырья. Сейчас приняты четыре подхода: 1) физический (механическое размельчение, пиролиз); 2) химический (кислотный и щелочной гидролиз, экстракция раство-

рителями, окислительная делигнификация и др.); 3) физико-химический (углекислотный взрыв и др.); 4) биологический (целлюлазы, целлюлолитические микроорганизмы).

Основная технологическая цепь ферментативного метода содержит такие звенья:

1. Получение глюкозного сиропа из отходов, содержащих целлюлозу и крахмал (размалывание, предварительная обработка, в случае необходимости — делигнификация, гидролиз).

2. Ферментация в темноте (на этой стадии можно подключать и сырье в виде сточных вод после соответствующей предварительной обработки). Результатом является выработка CH_4 , этанола, H_2 и органических кислот. Нейтральным выходом является также CO_2 .

3. Фотоферментация органических кислот с наработкой H_2 .

4. Выделение H_2 в чистом виде.

Схема данной технологической цепи представлена на рисунке 6.

Имеются теоретические расчеты, согласно которым биоконверсия 1 моля глюкозы дает 12 молей газообразного H_2 . Однако по реакции стехиометрии, выход водорода из глюкозы составляет 2,0–2,2 моль/моль [Цифры у сахарозы — 1,0–6,0 моль/моль [19].

Фотобиореакторы для производства H_2 бывают разных видов: тубулярные, плоскочастичные и колончатые. Примеры биореактора представлены на рисунках 7, 8.

Преимущества и недостатки биоводородной технологии

Преимущества биотехнологического производства водорода сводятся к следующему:

- процесс катализируются микроорганизмами в контролируемой водной среде при относительно невысокой температуре ($30\text{ }^\circ\text{C}$) и нормальном давлении;
- недорогая стоимость производства;
- низкое потребление энергии;
- децентрализованное производство энергии на малых установках в местах доступности биомассы и отходов, что дает экономию расходов на энергию и транспорт;
- высокая энергоёмкость у водорода (в 3 раза выше, чем у бензина: 1 г H_2 при сжигании дает 30 тыс. кал, а бензин — 11 тыс.);
- конечный продукт сжигания H_2 — вода — не представляет экологического риска.

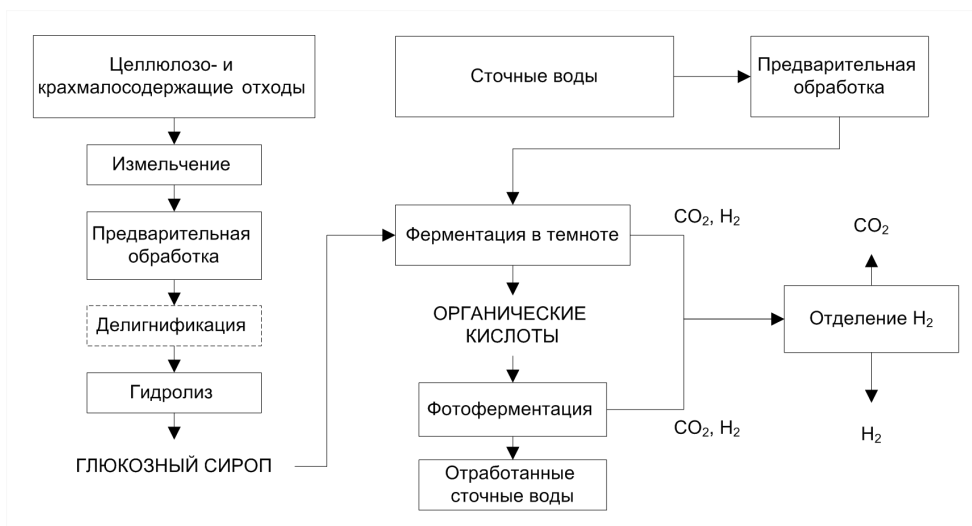


Рис. 6. Схема производства биоводорода из целлюлозо- и крахмалосодержащих сельскохозяйственных отходов и сточных вод пищевой промышленности [19]

Недостатки:

- высокая стоимость сырья;
- низкие скорость образования и выход конечного продукта;
- большие объемы биореактора.

Имеются указания на то, что себестоимость биоводорода в среднем составляет \$2 за килограмм.

Есть мнение, что ферментативный путь производства H₂ менее эффективен, чем фотолизный.

Состояние проблемы за рубежом

Как уже говорилось выше, проблема биоводорода должна быть вписана в водородную энергетику и биотопливо. Вопросы биотоплива рассматривались в предыдущих обзорах [1, 2, 3]. В отношении водородной энергетики ситуация такова.

Вначале о транспортных приложениях. К концу 2008 года во всем мире работало 2000 водородных автомобильных заправочных станций. Из общего числа

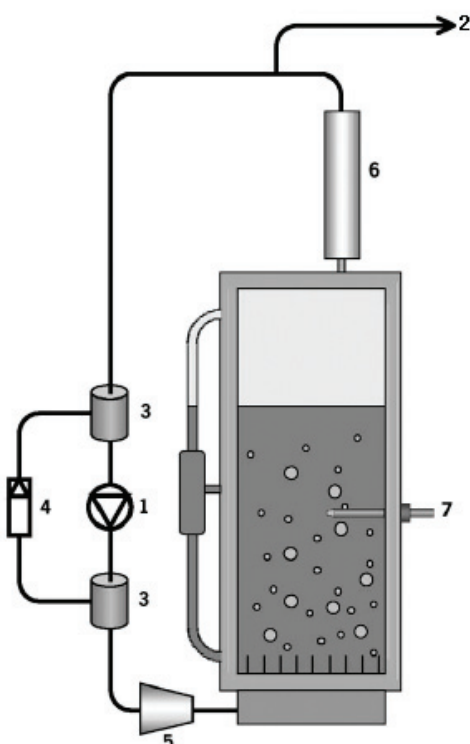


Рис. 7. Мультирубчатый фотобиореактор (по Venemann, 2000) [19]

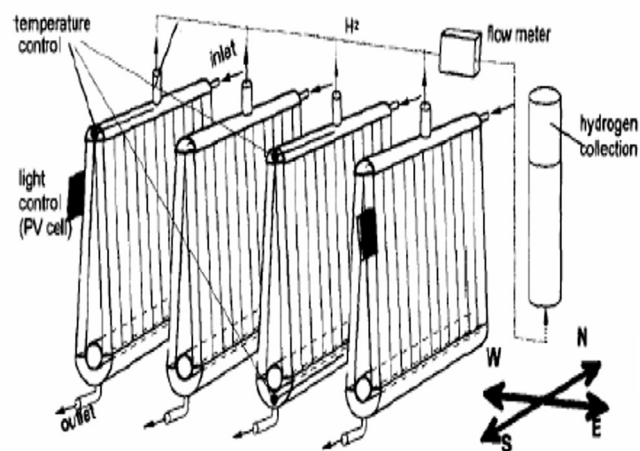


Рис. 8. Плоскопанельный воздушный фотобиореактор (flat panel airlift – FPA) [19]

заправочных станций, построенных в 2004–2005 гг., 8% работают с жидким водородом, остальные — с газообразным. В целом нынешняя водородная автомобильная инфраструктура представлена в таблице 1.

Таблица 1

Водородные заправочные станции по регионам мира

Страна	1995–2006 гг.	Построено новых в 2005 г.	Построено новых в 2006 г.
Северная Америка	46%	65%	59%
Япония	14%	15%	7%
Германия	13%	0	7%
Остальная Европа	14%	15%	0
Другие страны	13%	5%	27%

Источник: http://ru.wikipedia.org/wiki/Водородная_энергетика

Что касается автомобильного транспорта, то в 2006 г. было запущено в эксплуатацию около 100 новых типов автомобилей, автобусов и других транспортных средств на водородных топливных элементах.

В марте 2006 г. германский HyWays проект (<http://www.hyways.de>) опубликовал прогнозы проникновения водородного автотранспорта на европейский рынок (табл. 2).

Таблица 2

Прогнозы проникновения водородного автотранспорта на европейский рынок в % от общего количества автомобилей

Сценарий	2020	2030	2040	2050
Высокое проникновение	3,3%	23,7%	54,4%	74,5%
Низкое проникновение	0,7%	7,6%	22,6%	40,0%

Источник: http://ru.wikipedia.org/wiki/Водородная_энергетика

Очень важен в плане обсуждения темы биоводорода вопрос о малых стационарных приложениях водородной энергетики. Речь идет о станциях, которые устанавливаются в домах. Здесь динамика следующая: в 2005 г. во всем мире было запущено более 900 новых малых стационарных водородных энергетических установок (на 30% больше предыдущего года), в 2006 г. прибавилось еще 1500. Таким образом, в конце 2006 года в мире эксплуатировалось около 5000 малых стационарных водородных станций. По-видимому, это — перспективная ниша для биоводорода.

Что касается собственно проблемы развития производства биоводорода за рубежом, то там данное направление находится в фокусе постоянного внимания. Помимо развития производственной сферы, во всем мире в последнее время постоянно проводятся специальные конференции, посвященные биоводороду: в США, Нидерландах, Индии, Турции и других странах.

Биоводород в России: состояние и перспективы

В 70-х годах XX века в СССР функционировали 4 завода по производству биоводорода с использованием ацетонобутилового брожения сахарозы или крахмала: в Грозном, Нальчике, Талице Свердловской области, Ефремове Тульской области. Однако к концу 90-х годов оставались Грозненский и Ефремовский заводы. В сутки завод в Ефремове производил 29 тыс. куб. м биоводорода и до 50 т растворителей в пропорции: бутанол : ацетон : этанол — 13 : 4 : 1. В год этот завод производил 8,7 млн. куб. м водорода и соответственно 15 тыс. т растворителей.

В настоящее время тема биоводорода в РФ практически не поднимается, за редкими исключениями [4, 5]. Недостаточно обсуждаются и практические аспекты — о месте и значении биоводорода в отечественной биоэнергетике. Следует отметить, что и проблемы водородной энергетики в России в целом ныне не отвечают темпам и размаху работ за рубежом.

Между тем здесь имеется один существенный момент. Помимо общеэнергетической роли биоводорода, в зарубежной литературе все активнее обосновывается целесообразность использования биоводорода для функционирования так называемых «autonomous house» [10, 12, 13, 18]. Речь идет об уже накопившемся за рубежом опыте обеспечения энергетической самодостаточности отдельных жилищ за счет биоводородных установок. То есть вырисовывается концепция «биоэкодома», который может стать одним из модулей малых поселений будущего — «биоэкополисов», что крайне актуально для России

с ее демографией и традиционно слабой транспортной и энергетической инфраструктурой из-за гигантских, часто необжитых территорий.

Заключение

Проблема использования биоводорода не может обсуждаться вне его комплексирования с другими видами биотоплива (биодизель, биоэтанол, биогаз и др.).

Будучи рассматриваемым отдельно, изолированно, биоводород, несмотря на космические, энергетические и экологические достоинства, может сильно быть подвергнут критике сторонниками сырьевой экономики да и просто объективными менеджерами (высокая стоимость сырья, низкая скорость образования, незначительный выход H_2 из биореактора и т.д.).

Поэтому нами разделяется мнение о том, что будущее биоводорода лежит в интеграции процессов его получения в общую систему утилизации отходов и локального энергообеспечения [4].

Наконец, существенное значение биоводород приобретает как диверсифицированный приоритетный элемент конструкции биоэкополисов [12].

Автор выражает благодарность д.х.н., профессору С.В. Калюжному за ценные замечания и предложения по улучшению настоящей статьи.

Литература

1. *Василов Р.Г.* Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1: биодизель // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 47–54.
2. *Василов Р.Г.* Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 2: биоэтанол // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 50–60.
3. *Василов Р.Г.* Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 3: биогаз // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 3. — С. 54–61.
4. *Калюжный С.В.* Биотехнологическое получение водорода: фундаментальные принципы и лимитирующие факторы // Катализ в промышленности. — 2006. — № 6. <http://ind.catalysis.ru/2006/6.html>
5. *Панчухава Е.С.* Мировой рынок биотоплива глазами России // Академия энергетики. <http://kirosin.ru/?p=27>
6. *Федоров А.С.* Получение молекулярного водорода в фотобиореакторе с цианобактерией *Anabaena variabilis* PK84 в естественных условиях. 1999 <http://www.bioscience.ru/Conference/Ys99/Tesis/Biotechnol/Ust/Feodorov.html>
7. *Amao Yu.* Photoinduced biohydrogen production from biomass // Int. J. Mol. Sci. — 2008. — Vol. 9. — P. 1156–1172.
8. *Armor J.N.* The multiple rules for catalysis in the production of H_2 // Applied Catalysis A: General. — 1999. — Vol. 176. — P. 159–176.
9. *Asada Y. & Miyake J.* Photobiological hydrogen production // J. Biosci. Biotechnol. — 1999. — Vol. 88. — P. 1–6.
10. *Brenda R.V.* The new autonomous house. — Thames & Hudson, Hong Kong, China, 2000. — P. 19–30.
11. *Chen C.C., Lin C.Y.* Using sewage sludge as seed in an anaerobic hydrogen producing reactor // Proc. 25th Wastewater Treatment Technology Conference, Yun-Lin Taiwan, December, 1–2, 2000. — P. 368–372.
12. *Chen Shang-Yuan, Chu Chen-Yeon, Cheng Ming-jen, and Lin Chiu-Yue.* The autonomous house: a bio-hydrogen based energy self-sufficient approach // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2009, Apr. — Vol. 6(4). — P. 1515–1529.
13. *Chiang C.M., Chen C.H., Hsieh Y., Kao C.Y., Chen S.Y., Wang W.J.* The case study of sustainable healthy housing fitting in with subtropical Taiwan's climate and geography // Proceedings of the 2005 World Sustainable Building Conference, Tokyo, Japan, September 27–29. — P. 2280–2287.
14. *Das D., and Veziroglu T.N.* Hydrogen produced by biological processes: a survey of literature // Int. J. Hydrogen Energy. — 2001. — Vol. 26. — P. 13–28.
15. *Demirbas A.* Progress and recent trends in biofuels // Prog. Energy Combustion Science. — 2007. — Vol. 33. — P. 1–18.
16. *Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W. et al.* Microalgae: a green source of renewable H_2 // Trends in Biotechnol. — 2000. — Vol. 18. — P. 506–511.
17. *Hallenbeck P.C., and Ghosh D.* Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? // Trends in Biotechnology. — 2009, 30 March. — Vol. 27. — N 5. — P. 287–297.
18. *Harper P.* Sufficient unto itself the new autonomous house. — Resurgence, Devon, UK, 2002.
19. *Kargi F., Kapdan I.K.* Biohydrogen production from waste materials // Proc. Int. Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC 2005, Istanbul, Turkey, 13–15 July 2005. <http://www.unido-ichet.org/ihec2005/files/manuscripts/Kargi F.-Tr.pdf>.
20. *Koku H., Erolu O., Guenduez U., Uecel M. & Tuerker L.* Aspects of metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter spheroides* // Int. J. Hydrogen Energy. — 2002. — Vol. 27. — P. 1315–1329.

21. *Kumar N., Das D.* Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* ИТ-ВТ 08 // *Process Biochem.* – 2000. – Vol. 35. – P. 589–593.
22. *Levin D.B., Pitt L., Love M.* Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application // *Int. J. Hydrogen Energy.* – 2004. – Vol. 29. – P. 173–185.
23. *Mitsui A.* Biological hydrogen photoproduction (task B) // *Proc. of 1992 US Department of Energy / National Renewable Energy Laboratory Hydrogen Program Review.* May 6–7, Honolulu, Hawaii. NREL/CP-450-4972. – P. 129–156.
24. *Rogner M., Miyake J., Igarashi Ya. (eds.).* Biohydrogen III. Workshop on Biohydrogen 2002. – Elsevier, 2004. – 196 p.
25. *Saratale G.D. et al.* Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation – a review // *J. of Scientific & Industrial Research.* – 2008. – Vol. 67. – P. 962–979.
26. *Sarkar S., Kumar A.* A review of techno-economics of biohydrogen production technologies // *2007 ASABE Annual Meeting 071649.*
27. *Tsygankov A.A., Federov A.S., Kosourov S.N., Rao K.K.* Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under anaerobic condition // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2002. – Vol. 80. – P. 777–783.
28. *Winter C.J.* Into the hydrogen energy economy – milestones // *Int. J. Hydrogen Energy.* – 2005. – Vol. 30. – P. 681–685.
29. *Zaborsky O.R., Benemann J.R. (eds.).* Biohydrogen. – Springer, 1999. – 248 p.

Интернет-источники

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Biohydrogen>
http://en.wikipedia.org/wiki/Biological_hydrogen_production
http://ru.wikipedia.org/wiki/Водородная_энергетика
<http://kirosin.ru/?p=27>
<http://ind.catalysis.ru/2006/6.html>
<http://www.biotoplivo.ru>

PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT OF BIOFUEL PRODUCTION IN RUSSIA. THE REPORT 4: A BIOHYDROGEN.

R.G. VASILOV

Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

ТЕОРИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНЫХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПЕРАТИВНОГО МОНИТОРИНГА БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

О.Н. ПОНАМОРЕВА¹, В.А. АРЛЯПОВ¹, В.А. АЛФЕРОВ¹, А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{2*}

¹Тулский государственный университет;

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино

Введение

Экспресс-оценка степени загрязнения объектов окружающей среды, в частности, водоемов рек, озер и водохранилищ, органическими соединениями является важным и в некоторых случаях жизненно необходимым компонентом экологического контроля. Учитывая постоянно растущий перечень веществ, поступающих как загрязнители в окружающую среду, можно констатировать, что выполнение полного химического анализа является сложной и дорогостоящей процедурой. Эффективным инструментом анализа оказываются методы, основанные на интегральной оценке органических компонентов. В этой связи значительное внимание уделяется разработке биосенсорных методов контроля, позволяющих выполнить интегральную оценку загрязненности, значительно повышающих оперативность анализа и снижающих его стоимость [1].

Важнейшей интегральной характеристикой качества воды является биохимическое потребление кислорода (БПК) — количество растворенного кислорода (мг), необходимое для окисления всех биоразлагаемых органических соединений, находящихся в 1 дм³ воды. Оценка БПК — это эмпирический тест, в котором используют стандартизованную лабораторную процедуру, чтобы определить потребление кислорода в анализируемых пробах воды. БПК определяют условно по изменению содержания кислорода до и после размещения и выдерживания в течение определенного периода образца воды в специальных герметично закрытых колбах. Стандартный

метод определения БПК предполагает инкубирование насыщенной кислородом пробы воды, в которую вносят активный ил (смесь различных микроорганизмов), в течение 5, 7, 10 или 20 суток (БПК₅, БПК₇, БПК₁₀ или БПК₂₀, соответственно) при 20 °С [2]. Полученный результат характеризует суммарное содержание биохимически окисляющихся органических примесей в воде, а также способность воды к самоочищению. Весьма значительны изменения величин БПК₅ в зависимости от степени загрязненности водоемов. В соответствии с категорией водоема величина БПК₅ регламентируется следующим образом: не более 3 мг/дм³ — для водоемов хозяйственно-питьевого водопользования и не более 6 мг/дм³ — для водоемов хозяйственно-бытового и культурного водопользования. БПК тест находит также широкое применение на очистных сооружениях для оценки эффективности уменьшения биоразлагаемых соединений в процессах очистки стоков.

Традиционный БПК имеет серьезные ограничения по времени анализа. Отсутствие оперативности существенно снижает ценность традиционной методики. По указанной причине реально могут возникать экологически опасные ситуации, при которых остается «за кадром» поступление на водоочистные сооружения аварийно загрязненных вод или, наоборот, недоочистка их в процессе регенерации.

Для оперативного анализа разрабатываются методы оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Исследования по созданию БПК-биосенсоров проводятся с конца 70-х годов прошлого века [3, 4], но разработки таких систем интенсивно продолжаются и в настоящее время [5, 6]. Следует отметить, что с помощью биосенсоров возможно быстрое определение БПК (БПК_{бс}), которое близко к величине традиционного БПК₅. Корреляция данных, полученных с помощью биосенсорного анализатора, с данными, полученными методом БПК₅, может иметь значения по-

* Автор для переписки:

© 2009 г. Решетиллов Анатолий Николаевич,
д.х.н., профессор, зав. лабораторией биосенсоров,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрябина РАН,
142290 Пущино, Проспект науки, 5,
E-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

рядка 0,95–0,98 [7]. Для калибровки БПК-биосенсора используют специализированные синтетические сточные воды или биораспознающий элемент БПК-биосенсора создают на основе специфических микроорганизмов, способных к эффективному окислению веществ конкретных стоков.

Распространенность и востребованность исследований по разработке биосенсорных систем определения БПК закономерно привели к коммерциализации и промышленному выпуску ряда моделей. БПК-сенсорные системы все еще имеют ряд ограничений, которые затрудняют их применение: недостаток стандартизации и недоработки законодательства в большинстве стран, сложные требования к обслуживанию и недостаточная устойчивость применяемых культур микроорганизмов к действию тяжелых металлов и различных токсичных веществ [6].

В обзорах по микробным сенсорам [1], а также по применению биосенсоров для анализа объектов окружающей среды и экологическому мониторингу [6–8] представлены разделы, в которых приводятся примеры разработанных БПК-сенсоров. Валмслей (Walmsley) и Кинан (Keenan) в обзоре по применению дрожжей в биосенсорах [9] отметили важную роль биораспознающих элементов на основе эукариотических микроорганизмов в биосенсорах для решения проблем охраны окружающей среды, в том числе для определения БПК водных объектов. В обзоре Ли (Liu) и Маттисона (Mattiasson) [5] суммирована подробная информация о БПК-сенсорах тонкопленочного типа на основе кислородного электрода.

В данном обзоре авторы представили информацию о принципах функционирования, устройстве, аналитических характеристиках БПК-биосенсоров, свойствах биораспознающих элементов БПК-сенсоров, привели параметры функционирования, характеристики БПК-сенсоров различных типов.

1. Основы функционирования микробных биосенсоров для оценки БПК

1.1. БПК-сенсоры на основе кислородного электрода

В 1977 году Карубе (Karube) и др. опубликовали работу, в которой впервые описали микробный сенсор для быстрого определения БПК [3]; в качестве биоматериала были использованы микроорганизмы, взятые из активного ила очистных сооружений. Особенностью таких биосенсоров является то, что между пористой мембраной (чаще всего, целлюлозной) и газопроницаемой мембраной кислородного электрода (как правило,

тефлоновой) они содержат слой микробной пленки в качестве биологического распознающего элемента. Процесс контролируется диффузией субстрата, сигнал сенсора будет в определенной степени пропорционален концентрации легко окисляемых субстратов в образце.

Для получения ответа обычно используют два метода обработки отклика биосенсора: равновесный метод (определение по конечной точке, или динамический) и метод определения начальной скорости (кинетический) [10]. В равновесном методе для определения БПК_{бс} используется разность между током в двух равновесных состояниях. Время измерения составляет 15–30 мин. с последующим восстановлением в течение 30–60 мин. По методу определения начальной скорости, в качестве ответа сенсора используют начальное изменение силы тока от времени после добавления образца. Этот параметр отображает ускорение скорости микробного дыхания и в определенной степени пропорционален концентрации субстрата. В этом случае ответ сенсора регистрируется в течение 15–30 с, а время восстановления биораспознающего элемента составляет менее 10 мин. Более высокой чувствительности можно достичь при использовании в качестве ответа начальной скорости отклика биосенсора при незначительной потере в воспроизводимости [11]. Таким образом, кинетический метод обработки сигнала биосенсора более предпочтителен в том случае, когда необходим постоянный контроль БПК, например, в ходе очистки сточных вод, или при анализе большого числа проб [12].

В настоящее время разрабатываются новые биопленочные БПК-сенсоры на основе кислородного электрода [5–8]. При проведении исследований основное внимание уделяют совершенствованию параметров БПК-сенсоров: увеличение стабильности, повышение корреляции данных, полученных биосенсорным и стандартными методами оценки БПК₅.

1.2. Биореакторные сенсоры на основе кислородного электрода

Для быстрого определения БПК (БПК_{бс}) используют сенсорные системы биореакторного типа с респирометром для постоянного измерения дыхательной активности суспензии микроорганизмов. Строго говоря, в соответствии с определением такие системы не являются биосенсорами, так как биораспознающий элемент не находится в прямом контакте с преобразователем. Однако они нашли широкое применение на предприятиях по очистке сточных вод для непрерывного контроля степени очистки [13, 14]. Образцы сточных вод постоянно транспортируются через проточный реактор, имеющий

небольшой объем [15, 16]. В качестве биораспознающего элемента в таких системах используют неидентифицированные микроорганизмы из сточных вод, например, активный ил. Для повышения воспроизводимости результатов предложено использовать индивидуальные штаммы микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов, таких как *Trichosporon* [17], *Rhodococcus* и *Issatchenkia* [18].

Преимуществом биореакторной конфигурации распознающих элементов является то, что в таких системах легко заменить преобразователь. При этом не нарушается активность микроорганизмов. Кроме того, БПК-сенсор биореакторного типа имеет более стабильные рабочие характеристики по сравнению с биосенсорами биопленочного типа [19].

1.3. Микробные биосенсоры с использованием медиаторов

Некоторые синтетические соединения (искусственные акцепторы электронов) способны восстанавливаться определенными микроорганизмами, то есть конкурируют за электроны с кислородом (естественным акцептором электронов) [20]. Если эти соединения обладают обратимыми окислительно-восстановительными свойствами, то они могут служить переносчиками электронов от биокаталитических систем микроорганизмов на электрод (медиаторами электронного транспорта).

Преимущество использования медиаторов заключается в том, что результаты измерений становятся практически независимыми от парциального давления кислорода в среде, а также в том, что имеется относительная нечувствительность к изменениям pH. Таким образом, одним из наиболее перспективных направлений является разработка БПК-биосенсоров с применением медиаторов электронного транспорта [5, 20–25, 26]. В медиаторных микробных сенсорах генерируются токи в 100–1000 раз большие, чем при использовании кислородного электрода [27], что обеспечивает возможность создания микросенсоров. При использовании технологии изготовления печатных электродов возможно создание недорогих одноразовых биодатчиков на основе целых клеток микроорганизмов [28]. Предложена быстрая микробная технология измерения БПК в анаэробных условиях в присутствии косубстрата — гексацианоферрата (III) калия (MICREDOX®) [29].

1.4. Биотопливные элементы микробного типа как БПК-сенсоры

Карубе и др. [30] разработали сенсор на основе биотопливного элемента для определения БПК_{бс}. Принцип измерения основан на том, что генерируемый

в биотопливном элементе ток является результатом биокисления водорода или образования продуктов из органических соединений путем восстановления под действием бактерий *Clostridium butyricum* в анаэробных условиях. Значительный вклад в разработку БПК-сенсоров на основе безмедиаторного биотопливного элемента уже в начале XXI века внесли корейские исследователи Ким (Kim H.) с сотрудниками [31–35]. БПК-сенсор, как показано в работе [33], функционировал в течение 5 лет устойчиво без какого-либо обслуживания.

1.5. БПК-биосенсоры оптического типа

В связи с интенсивным развитием в конце прошлого века оптоволоконной техники появилась возможность для создания миниатюрных биосенсоров оптического типа [36–44]. При разработке оптических БПК-сенсоров существуют два подхода: использование люминесцентных бактерий в биораспознающем элементе сенсора или применение люминесцирующей подложки для биоматериала. В первом случае принцип измерения основан на соотношении между интенсивностью люминесценции, продуцируемой бактериями, и клеточной ассимиляцией органических соединений из образцов сточных вод [40–42, 44]. Во втором случае в материал подложки вносят кислородчувствительные красители, а в качестве биораспознающего элемента в этой матрице используют целые клетки микроорганизмов. Изменение содержания кислорода в пленке регистрируют с помощью красителя оптическими методами [36–40, 43]. Оптические биосенсоры обладают высокой чувствительностью и соответственно позволяют определять низкие значения БПК; возможно создание микроплат и микросенсоров, биосенсоров на чипе [40, 44].

1.6. Нестандартные методы формирования БПК-биосенсоров

Методы анализа БПК с использованием биосенсоров не ограничиваются описанными выше. Так, например, разработан биосенсор для непрерывной регистрации БПК очистных сооружений [45]. Основной рабочий принцип биосенсора основан на он-лайн измерении концентрации CO₂, произведенного деградацией микроорганизмами углеродной составной частью стоков.

Нестандартный подход для определения БПК описан в работе [46]. Образцы сточной воды различной степени очистки шведского целлюлозного завода и чистая вода были проанализированы с помощью амперометрического биосенсора с несколькими ячейками и электродами с применением математических методов хемометрии при обработке массива полученных данных

(так называемого биосенсорного «языка»). Образцы сточной воды были характеризованы химическим потреблением кислорода, биологическим потреблением кислорода, общим количеством органического углерода, подавлением нитрификации, ингибированием дыхания и токсичности по отношению к *Vibrio fischeri*, пресноводной морской водоросли *Pseudokirchneriella subcapita* и пресноводного ракообразного *Daphnia magna*.

В работе [47] представлен подход к детекции БПК, основанный на регистрации изменений температуры, вызванных микробиологической деструкцией органических соединений.

2. Биорецепторные элементы

2.1. Микроорганизмы как основа

Для создания биораспознающих элементов БПК-сенсоров используют либо чистые культуры с определенными потребительскими свойствами (широкий спектр окисляемых субстратов, устойчивость к воздействию негативных факторов окружающей среды или специфичность в отношении определенных стоков), либо смесь идентифицированных микроорганизмов (искусственные ассоциации), либо индуцируемый консорциум микроорганизмов, либо активный ил и даже термически убитые бактерии. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки.

Обычно БПК-биосенсоры на основе чистой культуры имеют преимущество в стабильности функционирования биосенсорной системы. В качестве биокатализаторов используют целые клетки бактерий (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*) и дрожжей (*Arxula adenivorans*, *Hansenula anomala*, *Klebsiella*, *Candida*, *Trichosporon*, *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae*). Дрожжи являются более предпочтительным биоматериалом для биосенсоров почти всех типов, поскольку устойчивы к негативным факторам окружающей среды [48, 49].

Для увеличения количества окисляемых субстратов используют ассоциации микроорганизмов, чаще всего, состоящие из двух штаммов, например, *Trichosporon cutaneum* и *Bacillus licheniformis* [50].

Для биосенсоров, основанных на живых клетках, требуется постоянное поддержание жизнедеятельности и поступление питательных веществ и минералов при длительном хранении. БПК-сенсоры на основе убитых температурой клеток лишены этого недостатка. Клетки, убитые температурой, могут храниться в фосфатном буфере в течение длительного периода при комнатной температуре [51–53].

2.2. Иммобилизация микроорганизмов

Микробные клетки на поверхности физико-химического преобразователя удерживают в большинстве случаев с помощью простой адсорбции, то есть клетки помещают, главным образом, на пористую мембрану путем всасывания или удерживания воды гидрогелем. В качестве гидрогелей применяют водный раствор поливинилового спирта [52], поликарбомоилсульфонат [53, 54]. Для миниатюризации БПК-сенсора использовали метод кросс-сшивания резины (ENT-3400) под действием УФ для иммобилизации клеток на поверхности микрокислородного электрода [55]. Разработан БПК-сенсор, биораспознающий элемент которого был приготовлен смешиванием магнитного порошка с активным илом. Намагниченный ил затем размещали на тефлоновой мембране катода и удерживали за счет магнитных взаимодействий [56].

Одним из перспективных современных направлений создания биораспознающих элементов на основе целых клеток микроорганизмов является разработка их иммобилизации в золь-гель матрицы [57, 58]. Такие элементы имеют высокую проницаемость для анализируемых проб, высокую прочность и стабильность, а также низкую токсичность для иммобилизованных микроорганизмов.

3. Характеристики биосенсоров различных типов

Эффективность биосенсора определяется его аналитическими и метрологическими характеристиками и рабочими параметрами. Они включают в себя свойства аналитического сигнала (величина и время отклика) в ответ на добавление анализируемого вещества, обратимость системы после удаления аналита, стабильность биодатчика, технику измерения, операционные условия и многое другое. Для получения количественной информации о содержании анализируемых веществ в образце необходимо знать калибровочные характеристики БПК-биосенсора, то есть зависимость аналитического сигнала от концентрации. При описании калибровки следует указывать, в каких условиях она была получена и для какого калибровочного раствора. Линейность зависимости ответов БПК-биосенсора от концентрации в определенном интервале является мерой возможности определения БПК при анализе сточных вод с различными концентрациями субстратов. Широкий линейный интервал желателен для точности и надежности измерений. Кроме собственно калибровочной зависимости, для сравнения эффективности биосенсоров используются

количественные характеристики: чувствительность и предел обнаружения [59].

Чувствительность (коэффициент чувствительности) определяется как максимальное значение производной величины отклика по концентрации. Другой важной характеристикой является предел обнаружения. Линейность и количественные характеристики калибровочной зависимости связаны с устройством преобразователя, типом сенсора, концентрацией клеток в распознающем элементе. БПК-сенсор может иметь различные линейные характеристики при использовании разных калибровочных растворов и образцов с варьирующим составом органических субстратов. В качестве растворов для калибровки прибора обычно используется раствор смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 205 мг/дм³ или другие смеси органических соединений (так называемые синтетические сточные воды). В настоящее время значительное внимание уделяют разработке калибровочных растворов — синтетических сточных вод, которые содержат примерный перечень тех соединений, которые являются основными компонентами анализируемых образцов воды [12, 39, 63, 64]. Ли с соавт. предложили концепцию нормализованного ответа, для того чтобы определить, подходит калибровочный раствор для этого образца или нет. Ответ биосенсора на калибровочный раствор должен напоминать ответ биосенсора на анализируемый образец воды [12].

Поскольку БПК-сенсоры разрабатывались для создания быстрого альтернативного аналитического метода, то анализ с помощью биосенсоров должен иметь такую же точность, как и традиционный метод. Повторяемость БПК-сенсоров биопленочного типа варьирует до 10–11% для сенсора на основе одного штамма и до 15% — для сенсоров, основанных на ассоциации микроорганизмов [5], что близко к стандартным методам.

Следует отметить, что сточные воды некоторых производств, например, зерноперерабатывающих предприятий (спиртовые, пивоваренные, крахмалопаточные), характеризуются высоким содержанием органических загрязнений, что приводит к гибели естественных экосистем вокруг этих предприятий. Основной проблемой является утилизация жидких отходов. Первый шаг утилизации состоит в проверке отходов на содержание органических компонентов. Для таких предприятий не только практически сложно, но и нерационально стремиться к созданию универсального БПК-сенсора. Целесообразно осуществлять разработку биосенсоров и выбор соответствующих микроорганизмов, которые обеспечивали бы наиболее эффективную детекцию БПК

в соответствии с конкретным типом сточных вод, то есть разрабатывать специализированные БПК-биосенсоры. Так, для контроля степени очистки сточных вод крахмалопаточного комбината в БПК-биосенсоре предложено использовать уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans*, которые обеспечивают высокую чувствительность по отношению к спиртам и сахарам [65, 27], что позволило разработать экспресс-метод контроля БПК стоков этого предприятия. Наиболее остро проблема загрязнения органическими соединениями окружающей среды стоит в спиртовой промышленности, в частности, в отношении утилизации основного отхода производства — послеспиртовой барды. Разработан биосенсорный метод определения общего содержания легкоокисляемых органических соединений в отходах ферментационных производств [66, 67]. Метод анализа с использованием разработанного биосенсора характеризуется высокой экспрессностью, высокой чувствительностью и селективностью.

Заключение

Таким образом, биосенсорная детекция БПК является достаточно развитым направлением аналитической биотехнологии. Однако БПК-сенсоры все еще имеют ряд ограничений, которые затрудняют их применение; поэтому проведение в России собственных исследований и выполнение работ, создающих основу для выпуска коммерческих БПК-биосенсоров, является актуальным. Биосенсорные анализаторы БПК представляют собой надежные, простые и дешевые аналитические инструменты и могут с успехом использоваться для контроля водных экосистем наряду с традиционными методами определения БПК.

Авторы благодарят за финансовую поддержку ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК НК-№ 37(4), ГК НК-№ 97П(1)).

Литература

1. D'Souza S.F. // Biosens. Bioelectron. // 2001. — Vol. 16. — P. 337–353.
2. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, Section 5210, 18th ed. — Washington, DC: American Public Health Association Water Works Association, American Water Environment Federation, 1992. — P. 5.1–5.6.

3. Karube I., Mitsuda S., Matsunaga T., Susuki S. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1977. – Vol. 19. – N 10. – P. 1535–1547.
4. Hikuma M, Suzuki H, Yasuda T, Karube I, Suzuki S. // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1979. – Vol. 8. – P. 289–297.
5. Liu J., Mattiasson B. // *Water Research.* – 2002. – Vol. 36. – P. 3786–3802.
6. Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol. 386. – N 4. – P. 1025–1041.
7. Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M. // *J. of Chem. Techn. Biotechn.* – 2001. – Vol. 76. – P. 337–348.
8. Baumner A.J. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – Vol. 377. – P. 434–445.
9. Walmsley R. M., Keenan P. // *Biotechn. Bioprocess Engineering.* – 2000. – Vol. 5. – N 6. – P. 387–394.
10. Tan T. C., Li F., Neoh K. G. // *Sens. Act., B.* – 1993. – N 10. – P. 137–142.
11. Yang Z., Sasaki S., Karube I., Suzuki H. // *Anal. Chim. Acta.* – 1997. – Vol. 357. – N 1–2. – P. 41–50.
12. Liu J., Bjornsson L., Mattiasson B. // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – Vol. 14. – N 12. – P. 883–893.
13. Iranpour R., Zermeno M. // *Water Environment Research.* – 2008. – Vol. 80. – N.4. – P. 24–29.
14. Spanjers H., Vanrolleghem P., Olsson G., Dold P. // *Water Sci. Technol.* – 1996. – Vol. 34. – N 31. – P. 117–143.
15. Spanjers H., Olsson G., Klapwijk A. // *Water Sci. Technol.* – 1993. – Vol. 28. – N 11–12. – P. 401–415.
16. Spanjers H., Klapwijk A. // *Water Sci. Technol.* – 1991. – Vol. 24. – N 7. – P. 29–32.
17. Sohn M.-J., Lee J.-W., Chung C., Ihn G.-S., Hong D. // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – Vol. 313. – N 3. – P. 221–228.
18. Heim S., Schnieder I., Binz D., Vogel A., Bilitewski U. // *Biosens. Bioelectron.* – 1999. – N. 14. – P. 187–193.
19. Praet E., Reuter V., Gaillard T., Vassel J.-L. // *Trends Anal. Chem.* – 1995. – Vol. 14. – N 7. – P. 371.
20. Tkac J., Vostiar I., Gorton L., Gemeiner P., Sturdik E. // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – N 18. – P. 1125.
21. Trosok S.P., Driscoll B.T., Luong J.H.T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 56. – P. 550–554.
22. Chen H., Ye T., Qiu B., Chen G., Chen X. // *Analytica Chimica Acta.* – 2008. – Vol. 612. – N 1. – P. 75–82.
23. Yoshida N., Hoashi J., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I. // *J. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 88. – P. 269–275.
24. Yoshida N., Yano K., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I. // *Analyst.* – 2000. – Vol. 125. – P. 2280–2284.
25. Nakamura H., Suzuki K., Ishikuro H., Kinoshita S., Koizumi R., Okuma S., Gotoh M., Karube I. // *Talanta.* – 2007. – Vol. 15. – N 72(1). – P. 210–216.
26. Nakamura H., Kobayashi S., Hirata Y., Suzuki K, Mogi Y, Karube I. // *Anal. Biochem.* – 2007. – Vol. 369. – N 2. – P.168–174.
27. Arlyapov V.A., Chigrinova E.Yu., Ponomareva O.N., Reshetilov A.N. Express detection of BOD in wastewaters of starch-processing industry / In: *Starch science and technology* / Ed. by G.E. Zaikov. – 2008. – P. 161–175.
28. Farré M., Barceló D. // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2001. – N 371. – P. 467–473.
29. Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Webber J., Haya J. // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – N 20. – P. 524–532.
30. Karube I., Matsunaga T., Tsuru S., Suzuki S. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1977. – N 19. – P. 1727–1760.
31. Kim M., Youn S.M., Shin S.H., Jang J.G., Han S.H., Hyun M.S., Gadd G.M., Kim H.J. // *J. Environ. Monit.* – 2003. – N 5. – P. 640–643.
32. Kim B.H., Chang I.S., Gil G.C., Park H.S., Kim H.J. // *Biotechnology Letters.* – 2003. – N. 25. – P. 541–545.
33. Moon H., Chang I.S., Kang K.H., Jang J.K., Kim B.H. // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – Vol. 26. – N 22. – P. 1717–1738.
34. Chang I.S., Jang J.K., Gil G.C., Kim M., Kim H.J., Cho B.W., Kim B.H. // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – Vol. 19. – N. 6. – P. 607–613.
35. Chang I.S., Moon H., Jang J.K., Kim B.H. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 20. – N. 9. – P. 1856–1859.
36. Jiang Y., Xiao L.-L., Zhao L., Chen X., Wang X., Wong K.-Y. // *Talanta.* – 2006. – Vol. 70. – N 1. – P. 97–103.
37. Lin L., Xiao L.-L., Huang S., Zhao L., Cui J.-S., Wang X.-H., Chen X.N. // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – Vol. 21. – N 9. – P. 1703–1709.
38. Kwok N.-Y., Dong S., Lo W., Wong K.-Y. // *Sens. Act., B: Chem.* – 2005. – Vol. 110. – N 2. – P. 289–298.
39. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I. // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – Vol. 15. – N 7–8. – P. 371–376.
40. Sakaguchi T., Kitagawa K., Ando T., Murakami Y., Morita Y., Yamamura A., Yokoyama K., Tamiya E. // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – Vol. 19. – N 2. – P. 115–121.
41. Hyun C.-K., Tamiya E., Takeuchi T., Karube I. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1993. – Vol. 41. – P. 1107–1118.
42. Karube I., Yokoyama K. // *NATO ASI Ser., Ser. E.* – 1993. – Vol. 252. – P. 281–288.
43. Pang H.L., Kwok N.Y., Chan P.H., Yeung C.H., Lo W., Wong K.Y. // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – Vol. 4. – N 11. – P. 4038–4082.
44. Sakaguchi T., Morioka Y., Yamasaki M., Iwanaga J., Beppu K., Maeda H., Morita Y. // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – Vol. 22. – N 7. – P. 1345–1395.
45. Vaiopoulou E., Melidis P., Kampragou E., Aivasidis A. // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 21. – N 2. – P. 365–371.
46. Tønning E., Sapelnikova S., Christensen J., Carlsson C., Winther-Nielsen M., Dock E., Solna R., Skladal P.,

- Norgaard L., Ruzgas T., Emnéus J.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 21. – N 4. – P. 608–617.
47. *Mattiasson B., Larsson P.O., Mosbach K.* // *Nature.* – 1977. – Vol. 268. – P. 519–520.
48. *Seo K.S., Choo K.H., Chang H.N., Park J.K.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009, Jan 20 [Epub ahead of print].
49. *Dhall P., Kumar A., Joshi A., Saxsena T.K., Manoharan A., Makhijani S.D., Kumar R.* // *Sens. Act., B: Chem.* – 2008. – Vol. 133. – N. 2. – P. 478–483.
50. *Suriyawattanakul L., Surareungchai W., Sritongkam P., Tanticharoen M., Kirtikara K.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 59. – P. 40–44.
51. *Tan T.C., Lim E.W.C.* // *Sens. Act., B: Chem.* – 2005. – Vol. 107. – P. 546–551.
52. *Qian Z., Tan T.C.* // *Wat. Res.* – 1999. – Vol. 33. – N 13. – P. 2923–2928.
53. *Tag K., Lehmann M., Chan C., Renneberg R., Riedel K., Kunze G.* // *Sensors and Actuators B.* – 2000. – Vol. 67. – P. 142–148.
54. *Chan C., Lehmann M., Chan K., Chan P., Chan C., Gruendig B., Kunze G., Renneberg R.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – Vol. 15. – P. 343–353.
55. *Lehmann M., Chan C., Lo A., Lung M., Tag K., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R.* // *Biosens. Bioelectron.* – 1999. – Vol. 14. – P. 295–302.
56. *Yang Z., Suzuki H., Sasaki S., Karube I.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 46. – N 1. – P. 10–14.
57. *Sakai Y., Abe N., Takeuchi S., Takahashi F.* // *J. Ferment. Bioeng.* – 1995. – Vol. 80. – N 3. – P. 300–303.
58. *Chen D., Cao Y., Liu B., Kong J.* // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – Vol. 372. – P. 737–739.
59. *Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – Vol. 18. – N 8. – P. 1023–1029.
60. *Thévenot R.D., Toth K., Durst A.D., Wilson G.S.* // *Biosens. Bioelectr.* – 2001. – Vol. 16. – P. 121–131.
61. *Kim M.-N., Park K.-H.* // *Sens. Act., B.* – 2001. – Vol. 80. – P. 9–14.
62. *Melidis P., Vaiopoulou E., Aivasidis A.* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2008. – Vol. 31. – N 3. – P. 277–352.
63. *Tanaka H., Nakamura E., Minamiyama Y., Toyoda T.* // *Water Sci. Technol.* – 1994. – Vol. 30. – N 4. – P. 215–227.
64. *Jung J., Sofer S., Lakhwala F.* // *Biotechnol. Tech.* – 1995. – Vol. 9. – N 4. – P. 289–294.
65. *Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А., Рогова Т.В., Блохин И.В., Чепкова И.Ф., Решетилов А.Н.* // *Вода: Химия и Экология.* – 2008. – № 3. – С. 20–22.
66. *Решетилов А.Н., Алферов В.А., Леденев В.П., Сергеев В.И.* // *Ликероводочное производство и виноделие.* – 2008. – Т. 3. – № 99. – С. 20–22.
67. *Решетилов А.Н., Алферов В.А., Леденев В.П., Сергеев В.И.* // *Ликероводочное производство и виноделие.* – 2008. – Т. 3. – № 100. – С. 24–27.

THEORY AND APPLICATION OF MICROBIAL BIOSENSORS FOR BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND DETECTION (REVIEW)

O.N. PONAMOREVA¹, V.A. ARLYAPOV¹, V.A. ALFEROV¹, A.N. RESHETILOV²

¹Tula State University;

²G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Moscow region

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЛАГОРОДНЫХ И ЦВЕТНЫХ МЕТАЛЛОВ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Т.Ф. КОНДРАТЬЕВА*

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Введение

В концепции развития металлургической промышленности России до 2010 года, изложенной на заседании Правительства РФ 16 июля 2002 года, одним из основных направлений развития цветной металлургии определен переход на использование более экологически чистых процессов, обеспечивающих снижение выбросов вредных веществ, вовлечение в производство низкокачественных промпродуктов и повышение комплексности использования минерального сырья.

Извлечение цветных и благородных металлов из колчеданных руд, концентратов и техногенных отходов представляет собой сложную проблему, так как большая часть сульфидных минералов находится в минеральных ассоциациях, образуя их взаимные сростания, а отдельные элементы входят в кристаллическую структуру сульфидных минералов, главным образом, пирита. Поэтому даже при тонком измельчении часть ценных металлов теряется с хвостами обогащения.

Биогидрометаллургические технологии извлечения благородных металлов из сульфидных руд и концентратов

В мировой практике для переработки упорных золотомышьяковых концентратов применяются технологии предварительного окислительного обжига или автоклавного выщелачивания для вскрытия тонкодисперсного золота, ассоциированного с сульфидными минералами, с последующим извлечением золота и серебра с применением традиционных гидрометаллургических процессов. Основными их недостатками являются сравнительно

низкое извлечение благородных металлов (по схеме с предварительным обжигом) и дороговизна аппаратурного оформления при низком извлечении серебра (по схеме с предварительным автоклавным выщелачиванием), а также загрязнение окружающей среды токсичными соединениями мышьяка и серы. В России в атмосферу выбрасывается до 4 млн. т диоксида серы в год, из них 1 млн. т — предприятиями ГМК «Норильский никель». Распространяющийся на сотни километров от пирометаллургических заводов диоксид серы оказывает глобальное вредное воздействие на окружающую среду.

Технология биогидрометаллургической переработки упорных золотомышьяковых концентратов основана на бактериальном окислении сульфидных минералов, прежде всего, арсенопирита и пирита, для вскрытия находящихся с ними в тесной ассоциации тонкодисперсных и субмикроскопических частиц золота и серебра, извлекаемых из продуктов биоокисления с применением гидрометаллургических процессов. Бактериальное окисление сульфидных минералов осуществляет определенная группа хемолитотрофных микроорганизмов (грамотрицательных и грамположительных бактерий и архей), способных использовать в качестве субстрата для жизнедеятельности недоокисленные соединения серы и ион двухвалентного железа при разных значениях рН (от 0 до 6,0) и в разных температурных диапазонах (от 4 до 95 °С) (табл. 1).

Оптимальному течению процесса соответствуют относительно мягкие условия — рН 1,7–2,2 и температура от 30 до 80 °С. Полное разрушение кристаллической решетки сульфидных минералов сопровождается переходом сульфидной серы в элементную и далее в ион сульфата, а всех металлов, кроме благородных, — в раствор. Технология позволяет вовлечь в промышленную эксплуатацию крупные месторождения золотомышьяковых руд, переработка которых другими методами невозможна или экономически нецелесообразна, а также связана с загрязнениями окружающей среды.

* Автор для переписки:

© 2009 г. Кондратьева Тамара Федоровна
д.х.н., зав. лабораторией Института микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Разнообразие ацидофильных хемолитотрофов

Микроорганизмы	Неорганические источники энергии	Оптимальные значения pH и температуры, °C/ пределы жизнедеятельности	Ссылки
Грамотрицательные бактерии:			
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ (S ²⁻), сульфидные минералы	pH = 1,7–2,5 / 1,0– 4,5; t = 28–30 / 2–37	Colmer, Hinkle, 1947; Kelly, Wood, 2000
<i>A. thiooxidans</i>	S ⁰ (S ²⁻)	pH = 2,0–3,0 / 0,5– 5,5; t = 28–30 / 2–37	Waksman, Joffe, 1922; Kelly, Wood, 2000
<i>A. caldus</i>	S ⁰ (S ²⁻)	pH = 2,0–2,5 / 1,0– 3,5; t = 45 / 32–52	Hallberg, Lindstrom, 1994; Kelly, Wood, 2000
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe ²⁺ , FeS ₂	pH = 1,8–2,2 / 1,5– 5,0; t = 30–45 / 2–50	Маркосян, 1972
<i>L. thermoferrooxidans</i>	Fe ²⁺	pH = 1,65–1,9 / 1,3– 4,0; t = 45–50 / 30–60	Головачева и др., 1992; Hippe, 2000
<i>L. ferriphilum</i>	Fe ²⁺ , FeS ₂	pH = 1,4–1,8; t = 30– 37	Coram and Rawlings, 2002
<i>L. ferrodiazotrophum</i>	Fe ²⁺	pH = 1,2; t = 37	Tyson et al., 2005
Грамположительные бактерии:			
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ (S ²⁻), сульфидные минералы	pH = 1,7–2,4 / 1,5–5,5; t = 50–55 / 20–60	Головачева и Каравайко, 1978
<i>S. acidophilus</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , сульфидные минералы	pH = 2,0; t = 45–50	Norris et al., 1996
<i>S. sibiricus</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , сульфидные минералы	pH = 2,0 / 1,1–2,6; t = 55 / 17–60	Меламуд и др., 2003
<i>S. thermotolerans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , S ₄ O ₆ ²⁻ , сульфидные минералы	pH = 2,0 / 1,2–2,0; t = 40 / 20–60	Bogdanova et al., 2006
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , FeS ₂	pH = 1,5–2,5 / 0,5–6,0; t = 35 / 4–40	Dufresne et al., 1996; Karavaiko et al., 2005
<i>Al. tolerans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , сульфидные минералы	pH = 2,0–2,7 / 1,5–5,0; t = 28–42 / 20–55	Коваленко и Малахова, 1983; Karavaiko et al., 2005
Архей:			
<i>Acidianus brierleyi</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ (S ²⁻), сульфидные минералы	pH = 1,5–2,0 / 1,0–6,0; t = 70 / 45–76	Segerer et al., 1986
<i>Ac. infernus</i>	S ⁰	pH = 1,5–2,0 / 1,0–5,5; t = 90 / 65–96	Segerer et al., 1986
<i>Ac. ambivalens</i>	S ⁰	pH = 2,5 / 1,0–3,5; t = 80 / 55–87	Zillig et al., 1986; Fuchs et al., 1996
<i>Ac. tengchongensis</i>	S ⁰	pH = 2,5 / 1,5–5,0; t = 70 / 55–80	He et al., 2004
<i>Ac. manzaensis</i>	S ⁰	pH = 1,2–1,5 / 1,0–5,0; t = 80 / 60–90	Yoshida et al., 2006

<i>Metallosphaera sedula</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , сульфидные минералы	pH = 1,5–2,0; t = 50–80	Huber et al., 1989
<i>M. prunae</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , сульфидные минералы	pH = 3,0 / 1,0–5,0; t = 70 / 55–80	Fuchs et al., 1995
<i>M. hakonensis</i>	S ⁰ , (S ²⁻), S ₄ O ₆ ²⁻	pH = 3,0 / 1,0–4,0; t = 70 / 50–80	Takayanagi et al., 1996; Kurosawa et al., 2003
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	S ⁰ , (S ²⁻), S ₄ O ₆ ²⁻	pH = 2,5 / 2,0–4,0; t = 70 / 55–85	Brock et al., 1972
<i>Sul. solfataricus</i>	S ⁰ , (S ²⁻), S ₄ O ₆ ²⁻	pH = 4,5 / 3,5–5,0; t = 70 / 55–85	Zillig et al., 1980
<i>Sul. shibatae</i>	S ⁰	pH = 3,0; t = 81	Grogan et al., 1990
<i>Sul. metallicus</i>	S ⁰	pH = / 1,0–3,5; t = 65 / 50–75	Huber and Stetter, 1991
<i>Sul. yangmingensis</i>	S ⁰ , (S ²⁻), S ₄ O ₆ ²⁻	pH = 4,0 / 2,0–6,0; t = 80 / 65–90	Jan et al., 1999
<i>Sul. tokodaii</i>	S ⁰	pH = 2,5–3,0 / 2,0–5,0; t = 80 / 70–85	Suzuki et al., 2002
<i>Sul. tengchongensis</i>	S ⁰	pH = 3,5 / 2,5–4,5; t = 85–90 / 65–95	Xiang et al., 2003
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Fe ²⁺ , FeS ₂	pH = 1,7–1,8 / 1,3–2,2; t = 35 / 15–45	Golyshina et al., 2000
<i>F. acidarmanus</i>	Fe ²⁺	pH = 1,2 / 0–1,5; t = 42 / 23–46	Dopson et al., 2004
<i>F. cupricumulans</i>	Fe ²⁺	pH = 1,0–1,2; t = 53 / 22–63	Hawkes et al., 2006

Технология включает в себя либо чановое (в реакторах с пневмомеханическим перемешиванием и аэрацией), либо кучное (в отвалах) бактериально-химическое окисление сульфидных минералов. На рисунке 1 представлена технологическая схема биогидрометаллургической переработки золотосодержащей сульфидной руды.

Эта технология разработана совместно тремя институтами: Учреждением Российской академии наук Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (ИНМИ РАН), Московским научно-исследовательским институтом стали и сплавов (МИ-СиС) и Центральным научно-исследовательским геолого-разведочным институтом цветных и благородных металлов (ЦНИГРИ). Принимали участие также Иргиредмет, Гидроцветмет (Новосибирск) и МГУ им. М.В. Ломоносова, а в последнее время — ЗАО ЗДК «Полус». Технология испытана в лабораторных и полупромышленных условиях и показала хорошие результаты на большом количестве разнообразных типов руд и концентратов. Она позволяет перерабатывать даже высокомышьяковые упорные золото- и серебросодер-

жащие концентраты. При этом достигается высокая степень окисления и вскрытия сульфидных минералов, а последующим методом сорбционного цианирования извлекается до 98% тонкодисперсного золота и более 90% серебра, что значительно превышает извлечение их прямым цианированием или пирометаллургическим обжигом. Экологическая безопасность метода обеспечена цикличностью технологических схем. Исключается образование и выделение ядовитых летучих форм мышьяка и сернистого ангидрида. Технология энергосберегающая и характеризуется сравнительно низкими капитальными и эксплуатационными затратами. Применима она для извлечения золота из руд и концентратов разного минералогического состава и с разными соотношениями элементов. Например, эффективность биогидрометаллургической технологии показана на гравитационном концентрате Неждановского ГОКа, который содержит 38% пирита и 41% арсенопирита; на концентрате руды Наталкинского месторождения — 20–36% арсенопирита, 2–10% пирита, 0,15–0,2% сфалерита, 0,2–0,3% пирротина, 0,1–0,09% халькопирита; на флотационном

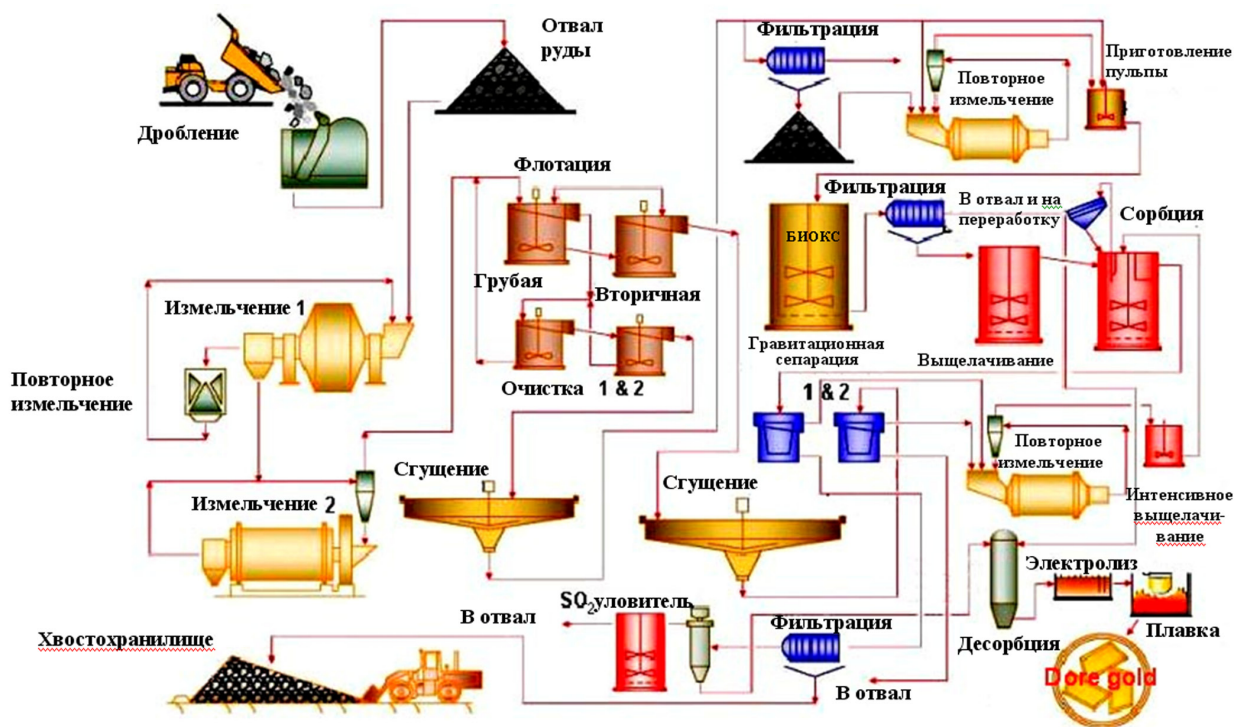


Рис. 1. Технологическая схема биогидрометаллургической переработки золотосодержащей сульфидной руды
www.polyusgold.com

золотомышьяковом концентрате руды Олимпиадинского месторождения — 40–50% пирротина, 7–9% пирита и 20–30% арсенопирита; на флотационном концентрате руды Майского месторождения — 28–30% пирита, до 12% арсенопирита, 2% антимонита и др.

Положительный опыт освоения биогидрометаллургической технологии для переработки золотосодержащих концентратов на первом предприятии Fairview (ЮАР), применившим в 1986 г. для переработки упорных золотосодержащих концентратов чановое бактериальное выщелачивание — цианирование, способствовал развитию работ в данном направлении, как в ЮАР, так и в Австралии, Бразилии, России и в других регионах.

В настоящее время биотехнология для переработки золотосодержащих руд и упорных золотосодержащих концентратов внедрена на 17 предприятиях золоторудной промышленности Австралии, России, США, ЮАР, Китая, Казахстана и других стран (табл. 2).

Практика промышленного внедрения биовыщелачивания показала, что удельные капитальные и эксплуатационные затраты на 1 т концентрата зависят от мощности проектируемой установки. С увеличением мощности установки бактериального выщелачивания, несмотря на рост капитальных вложений, удельные капитальные и эксплуатационные затраты на 1 т концентрата (или на 1 м³ биореактора), понижаются (рис. 2, 3).

При сопоставимых мощностях для внедрения биотехнологии требуется значительно меньше капитальных вложений, в некоторых случаях сокращаются сроки строительства, эксплуатационные затраты на 1 т концентрата снижаются до 25%, а извлечение золота повышается (табл. 3).

Биогидрометаллургические технологии выщелачивания цветных металлов из сульфидных руд и концентратов

Большая часть исследований процессов выщелачивания цветных металлов проведена на медьсодержащих субстратах. С конца 80-х и начала 90-х годов XX века основными направлениями технического прогресса в области переработки низкосортных, окисленных, труднообогатимых медных руд являются: разработка и применение процессов кучного выщелачивания или выщелачивания в отвалах (в том числе с использованием бактерий) и извлечения меди из растворов методом жидкостной экстракции.

Проводятся также работы по извлечению меди из растворов методом сорбции. Для перевода меди в раствор различают несколько методов выщелачивания руд и других медьсодержащих материалов, имеющих промышленное применение.

Таблица 2

Золотодобывающие предприятия, использующие биогидрометаллургическую технологию (Lawrence R.W., 1994; Brierley C.L., 1995; Brierley J.A. and Brierley C.L., 2001; Fernando A., 2002)

Предприятие, страна	Наименование технологии	Мощность, т концентрата (руды) / сутки	Годы ввода и расширения
Упорные золотосодержащие концентраты (чановое биовыщелачивание)			
Fairview (ЮАР)	BIOX®	14 35 55	1986 1991 1999
Austin, США	BIOX®	45–50	1989
Fairview, ЮАР	BIOX®	35	1986–1999
Sao Bento, Бразилия	BIOX®	150 300 380	1991 1994 1998
Harbour Lights, Австралия	BIOX®	40	1991
Wiluna, Австралия	BIOX®	115 154	1993 1996
Ashanti-Sansu, Гана	BIOX®	720 960	1994 1995
Tamboraque, Перу	BIOX®	60	1998
Youanmi, Австралия	Bac Tech	120	1994
Kasese Cobalt Co. Ltd. (KCCL), Уганда	BRGM/Signet/KCCL	240	1998
Beaconsfield, Австралия	Mintek/Bac Tech	68	1999
Laizhou, Китай	Mintek/Bac Tech	100	2001–2004
ЗАО «Полюс», Россия	BIONORD®	300 1000	2001 2006

ЗАО ГМК «Алтын Аймак», Казахстан	BIOX®	—	2004
Кокпатас, Узбекистан	BIOX®	2163	2006
Золотосодержащие руды			
Tonkin Springs, США	Чановое биовыщелачивание	1500	1991–1998
Mount Leyshon, Австралия	Кучное биовыщелачивание	1370	1992
Carlin, США	БиоPro (кучное биовыщелачивание)	10000	1995
Agnes, ЮАР	ГЕОСОАТ® (кучное биовыщелачивание)	50	2003
ОАО «АЛЕЛ», Казахстан	Кучное биовыщелачивание	—	2004

Методами выщелачивания являются: выщелачивание в отвалах, кучное выщелачивание, подземное выщелачивание, выщелачивание в чанах, автоклавное выщелачивание. На рисунках 4 и 5 представлены схемы процессов кучного и подземного выщелачивания. Растворы подаются через скважины при подземном выщелачивании или путем разбрызгивания, или создания прудков на поверхности отвалов при кучном выщелачивании металлов. В руде в присутствии окислителей (бактерии, кислород, трехвалентное железо) и при оптимальных условиях орошения руды сульфидные минералы окисляются, а цветные металлы в кислой среде переходят в растворимое состояние. Металлы в растворах концентрируют методом экстракции и затем извлекают электролизом. После извлечения ценных элементов растворы опять поступают на орошение руды (схема замкнутая). Выбор метода выщелачивания зависит от места залегания руды или других медьсодержащих материалов, ее качества и содержания в ней меди, а также от характера сопутствующих минералов и принятой схемы переработки. Окисленные медные минералы (кроме куприта) и сульфидные минералы — халькозин и ковеллин — наиболее легко поддаются выщелачиванию. Извлечение меди из окисленных минералов может достигать 70–90% в течение нескольких недель или месяцев.

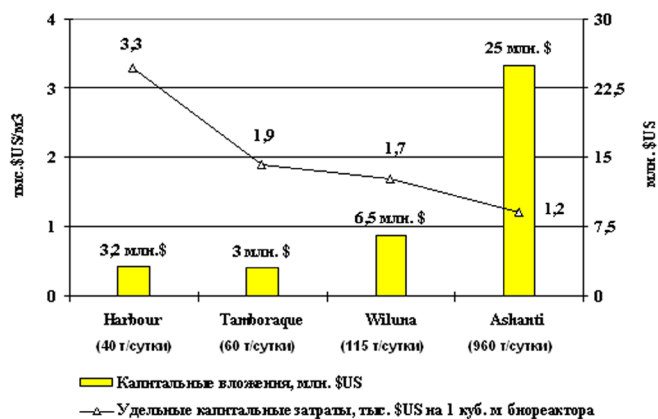


Рис. 2. Капитальные вложения и удельные капитальные затраты на 1 м³ биореактора при внедрении биотехнологии

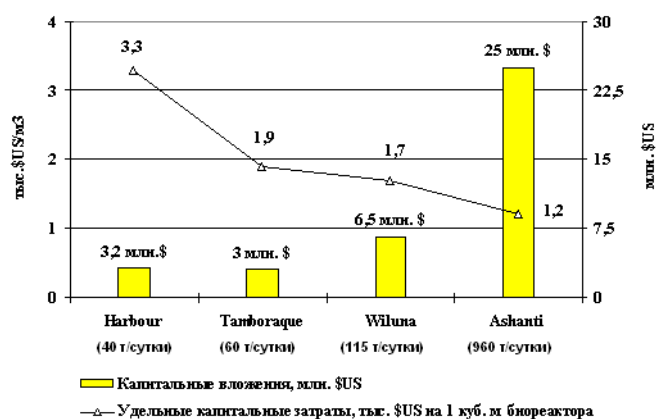


Рис. 3. Удельные капитальные вложения и эксплуатационные затраты на 1 т при переработке золотосодержащих концентратов по биотехнологии

медно-серного комбината (1987–1989 гг.); выщелачивание меди из руд Бошекульского месторождения (1990 г.); выщелачивание цветных металлов из цинковоколчеданной руды Сафьяновского месторождения и медноколчеданной руды Гайского месторождения (1990–1993 гг.); кучное выщелачивание забалансовых руд Волковского месторождения (1992 г.). Примерами организации процессов кучного бактериального выщелачивания в России является кучное выщелачивание бедных медно-цинковых руд на Николаевском руднике и выщелачивание меди из бедных окисленных отвалов на Коунрадском руднике (2002 г.).

Наиболее интересной в настоящее время является разработка технологии выщелачивания медной руды Удоканского месторождения. Технология кучного бактериального выщелачивания наиболее эффективна для бедных медных руд Удоканского месторождения (содержание их составляет 25% от общих запасов). Процесс выщелачивания протекает и при внешней отрицательной температуре в присутствии окислителя – трехвалентного железа. Извлечение меди составляет выше 90%.

Промышленное использование технологий кучного бактериального выщелачивания применяется в основном для бедных медных руд, отвалов и хвостов обогащения в странах с теплым климатом – Чили, Перу, Австралии, Мексике и др. (табл. 4), а также для переработки бедных и труднообогатимых золотых руд – Agnes (ЮАР), ЗАО ГМК «Алтын Аймак» (Казахстан).

Таблица 3

Экономическое сопоставление технологии биовыщелачивание – цианирование с вариантами пирометаллургической и автоклавной технологий переработки упорных золотосодержащих концентратов (Coggans 1993; Лодейщиков, 1999)

Показатели	Автоклавное окисление-цианирование	Обжиг-цианирование
Снижение капитальных вложений, %	20–40%	12–20%
Уменьшение эксплуатационных затрат на 1 т концентрата	до 10%	8–25%
Повышение извлечения золота	до 13%	2–13%
Уменьшение сроков строительства	до 25%	–

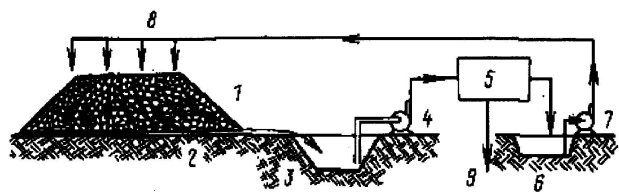


Рис. 4. Схема процесса кучного выщелачивания: 1 – куча, 2 – поверхность почвы, 3 – прудок для сбора продуктивных растворов, 4 – насос, 5 – желоба для цементации, 6 – прудок для отработанного раствора, 7 – насос, 8 – система орошения отвала, 9 – металл

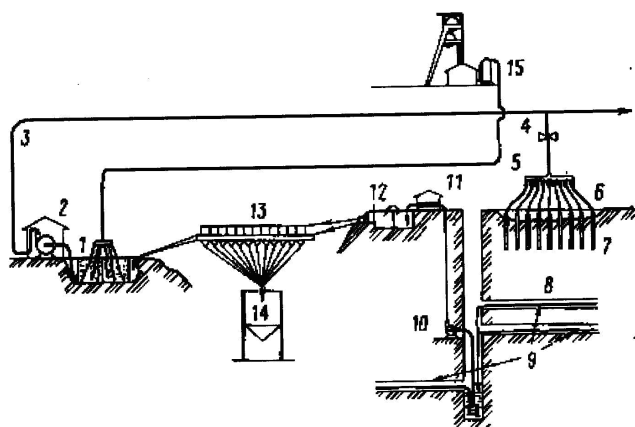


Рис. 5. Схема подземного бактериального выщелачивания меди на руднике Дегтярский: 1 – аэрация рециркулирующего раствора, 2 – насосная станция, 3 – распределительный трубопровод для подачи растворов, 4 – кларан, 5 – разветвленный трубопровод, 6 – трубопровод, 7 – нагнетательные скважины, 8 – рудное тело, 9 – дренажные желоба, 10 – насос для подачи продуктивных растворов, 11 – лимниграфная установка, 12 – отстойник, 13 – желоб для осаждения, 14 – бункеры для цветной меди, 15 – компрессорная установка

Компания Titan Resources NL испытала на опытном заводе и внедрила кучное выщелачивание медно-никелевых руд месторождения Radio Hill (Австралия) с использованием термофильных бактерий или комбинацией их с мезофильными. Выщелачиванием из медно-никелевой руды с содержанием 0,73% Ni и 0,87% Cu при температуре 45–60 °С извлекается более 90% никеля, меди и кобальта. Компания Titan Resources NL получила несколько новых штаммов бактерий для использования при выщелачивании руд, которые могут существовать в соленой среде с концентрациями солей, в 6 раз превышающими концентрации в морской воде, то есть для процесса можно использовать морскую воду.

Для низкосортных руд, содержащих окисленные и вторичные минералы меди, время бактериального выщелачивания при степени окисления 75–80% изменяется в пределах 50–100 дней в зависимости от вещественного состава и крупности выщелачиваемого материала (при химическом выщелачивании – от 250 до 600 дней). Для улучшения кинетики выщелачивания при бактериальном окислении вторичных сульфидных минералов меди желательна аэрация кучи.

Таблица 4

Основные горнорудные предприятия, использующие технологию кучного выщелачивания медной руды (Lawrence R.W., 1994; Brierley and Brierley C.L., 2001; Fernando A., 2002; Drescher W.H., 2004)

Предприятие, страна	Производительность по руде, тыс. т/сутки	Содержание меди, %	Год ввода
Lo Aguirre, Chile	16	1,5	1980
Mt. Leyshon, Australia	1,37	0,15	1992–1995
Cerro Colorado, Chile	16	1,4	1993
Salvador QM, Chile	–	0,3–0,4	–
Collahuasi, Chile	–	1,44	–
Chuquicamata SBL, Chile	–	0,6–0,8	1998
Girilambone, Australia	2	3	1993
Ivan Zar, Chile	1,5	2,1	1994
Quebrada Blanca, Chile	17,3	1,3	1994
Andacollo, Chile	16	1	1996
Dos Amigos, Chile	3	2,5	1996
Cerro Verde, Peru	32	0,7	1996
Zaldivar, Chile	20	1,4	1998
S&K Copper, Myanmar	15	1,25	1998
Cananea, Mexico	–	0,6	1980

Установлено, что кинетика окисления вторичных сульфидных и окисленных медных минералов значительно повышается при бактериальном выщелачивании по сравнению с обработкой серной кислотой и сернокислыми растворами окисного железа, а халькопирит (основной медный минерал в медных рудах) является наиболее трудноокисляемым минералом при кучном выщелачивании.

Капитальные затраты на организацию кучного бактериального выщелачивания значительно ниже (примерно на 50%) по сравнению с уровнем затрат на технологию плавка-рафинирование. Как показывает практика, прямые эксплуатационные затраты при переработке низкосортных медных руд кучным бактериальным выщелачиванием составляет 400–500 долл. США/т (0,18–0,23 центов/lb) катодной меди.

В целом, полная себестоимость производства катодной меди в зависимости от содержания меди в руде изменяется в пределах 660–1340 долл. США/т, что ниже полной себестоимости производства 1 т меди рафинированной пирометаллургическими методами (рис. 6).

До недавнего времени не было ни одного примера кучного выщелачивания никеля в условиях Севера. В Финляндии, в Sotkamo, находится одно из крупнейших известных сульфидных месторождений никеля в Европе. В руде содержатся также цинк и кобальт. Летом 2005 г. была насыпана куча в 50000 т (помол 80% класса – 8 мм) (Riekkola-Vanhanen M., 2007). Пилотная куча была инокулирована аборигенными микроорганизмами, выделенными из этого месторождения. Число бактерий в выщелачивающем растворе – 106–108 клеток/мл. Вскоре температура выщелачивающего раствора повысилась до 50 °С благодаря экзотермическим процессам в результате окисления пирротина и пирита и сохранялась в зимних условиях Севера. Получение металлов из растворов началось в ноябре 2005 года. В конце 2006 г. было выщелочено 94% никеля, 83% цинка, 3% меди и 14% кобальта. Эти результаты свидетельствуют о перспективности кучного выщелачивания цветных металлов в условиях Севера.

Наряду с кучным выщелачиванием руд и концентратов цветных металлов разрабатываются технологии чанового выщелачивания.

Основными производителями медных и цинковых концентратов для металлургических заводов России являются горно-обогатительные комбинаты Урала – Учалинский и Гайский ГОКи, Сибайский медно-серный комбинат, которые перерабатывают почти 90% медно-цинковых руд России. Эти руды являются труднообогатимыми, процесс их переработки характеризуется значительными потерями цинка и меди в отвальных хвостах и некондиционных продуктах. Как показали многочисленные исследования последних лет, задачу селективного разделения сложных сульфидных продуктов можно решить с использованием чанового процесса бактериального выщелачивания. В 2005 г. были проведены опыты по бактериальному выщелачиванию пробы промпродукта Учалинской обогатительной фабрики. Исходный продукт содержал 15,7% цинка, 0,89% меди, 33,6% железа и 46,5% серы. Было достигнуто извлечение цинка в раствор 78,1%. При бактериальном выщелачивании медно-цинковых продуктов в первую очередь выщелачивается цинк, и концентрация его (20%) вполне достаточна для использования растворов в качестве реагента – цинкового купороса. При необходимости можно выщелочить медь и выделить ее в виде цементной. Остатки выщелачивания представляют собой высококачественный пиритный концентрат.

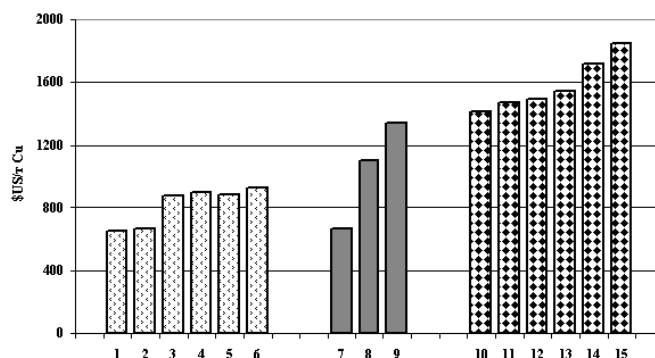


Рис. 6. Полные эксплуатационные затраты при производстве 1 т рафинированной меди с использованием различных технологий.

Столбцы 1–6: Добыча руды – кучное химическое выщелачивание окисленных медных руд – технология SX-EW: 1 – Morenci, США; 2 – Radomiro Tomic, Чили; 3 – Chuquicomata, Чили; 4 – El Tesoro, Чили; 5 – El Abra, Чили; 6 – Cerro Colorado, Чили.

Столбцы 7–9: Добыча руды – кучное бактериальное выщелачивание окисленных медных руд – технология SX-EW: 7 – Collahausi (1,44% Cu), Чили; 8 – Chuquicamata (0,6–0,8% Cu), Чили; 9 – Salvador (0,3–0,4% Cu), Чили.

Столбцы 10–15: Добыча руды – обогащение – плавка-рафинирование: 10 – Эрдэнэт, Монголия; 11 – Los Pelambres, Чили; 12 – Cuajone, Перу; 13 – Batu Hijau, Индонезия; 14 – Highland Valley, Канада; 15 – Bingham Canyon, США. (Dreisinger D. et al., 2002; Peacey J. et al., 2003; Dresher W.H., 2004)

тимыми, процесс их переработки характеризуется значительными потерями цинка и меди в отвальных хвостах и некондиционных продуктах. Как показали многочисленные исследования последних лет, задачу селективного разделения сложных сульфидных продуктов можно решить с использованием чанового процесса бактериального выщелачивания. В 2005 г. были проведены опыты по бактериальному выщелачиванию пробы промпродукта Учалинской обогатительной фабрики. Исходный продукт содержал 15,7% цинка, 0,89% меди, 33,6% железа и 46,5% серы. Было достигнуто извлечение цинка в раствор 78,1%. При бактериальном выщелачивании медно-цинковых продуктов в первую очередь выщелачивается цинк, и концентрация его (20%) вполне достаточна для использования растворов в качестве реагента – цинкового купороса. При необходимости можно выщелочить медь и выделить ее в виде цементной. Остатки выщелачивания представляют собой высококачественный пиритный концентрат.

Преимущества предложенного биотехнологического метода переработки медно-цинковых продуктов заключаются в высокой степени селективности выщелачивания металлов, простоте аппаратного оформления, невысокими капитальными затратами и эксплуатационными расходами. По сравнению с пирометаллургическими методами не требуется высоких температур, практически исключено загрязнение окружающей среды.

Учалинский ГОК перерабатывает 3,5 млн. т труднообогатимой медно-цинковой руды в год. При дефиците исходного сырья основным источником повышения извлечения металлов является более глубокая переработка исходной руды. Это можно решить путем вывода промпродукта в отдельный цикл переработки биогидрометаллургическим методом.

Укрупненные технико-экономические показатели процесса

Годовая стоимость металлов с учетом степени извлечения на установке биотехнологии — 12,2 млрд. руб.

Капитальные затраты на строительство — 7,0 млрд. руб. (в том числе НИОКР — 0,5 млрд. руб.).

Эксплуатационные затраты — 3,0 млрд. руб.

Срок окупаемости затрат — 1,0 год.

МИСиС совместно с ИНМИ РАН было выполнено технико-экономическое обоснование строительства биотехнологической установки для переработки хвостов медно-пиритной флотации ОФ Учалинского ГОКа (2000 г.).

Получение цветных металлов, в частности цинка и меди, с применением бактериального выщелачивания относится к перспективным и экологически чистым технологиям. Однако промышленное внедрение этого процесса сдерживается недостаточно высокой его скоростью и, вследствие этого, высокой продолжительностью, достигающей 100–120 часов. Поэтому поиски новых, более эффективных технологий — актуальная задача настоящего времени.

Развитие новых более эффективных технологий переработки минерального сырья, содержащего цветные металлы

Развитие новых эффективных технологий для переработки минерального сырья является одним из важнейших факторов научно-технического прогресса. Это, прежде всего, связано с тем, что резко изменились свойства руд и концентратов, практически не подлежащих

переработке традиционными технологиями. Первостепенное значение приобретает и проблема комплексного и рационального использования полезных ископаемых.

Наиболее близкими по составу Норильским медно-никелевым рудам являются медно-никелевые руды Камчатского региона. В Камчатском регионе находится 14 перспективных рудопроявлений и более 50 точек минерализации никеля, представленных богатыми сульфидными медно-никелевыми комплексными рудами, содержащими, кроме никеля и меди, кобальт, серебро и платиноиды. К современным технологиям переработки минерального сырья, кроме требования максимальной полноты и комплексности извлечения полезных металлов, добавляется соблюдение природоохранных ограничений, которые наиболее жестко стоят в Камчатском регионе и в районах Севера.

Актуальной задачей является создание современной биогидрометаллургической технологии с высокой степенью извлечения металлов, отвечающей требованиям охраны окружающей среды.

Применение технологии эксплуатации природных недр низкой степени переработки — извлечение наиболее доступной части металлов для получения максимальной прибыли — не соответствует требованиям рационального природопользования. Технология автоклавной переработки руды, отличающаяся высокими капитальными, материальными и энергетическими затратами, не соответствует экологическим требованиям.

В качестве примера получения цветных и благородных металлов с использованием чановой биогидрометаллургической технологии может служить руда месторождения Шануч, содержащая никеля — 6,36%, меди — 1,65%, кобальта — 0,27%, железа — 33,9%, серы — 21,8%, окислов кремния — 15,7%, платины — 2,6 г/т, палладия — 0,75 г/т, золота — 0,5 г/т, серебра — 11,3 г/т. Лабораторные исследования по биотехнологической переработке этого концентрата показали принципиальную возможность эффективного выделения из этого продукта цветных металлов. Так, в процессе выщелачивания в раствор переходило 99% никеля, 98% кобальта и 95% меди, выделение которых из раствора в виде товарных продуктов проводилось стандартными способами.

Расчет экономической эффективности

При эффективности извлечения металлов по представленной технологии (до получения катодных металлов): никеля — 85%, меди — 75%, кобальта — 50% количество никеля из 1 т руды составит 54,06 кг, меди — 12,37 кг, кобальта — 1,35 кг. Прибыль от реализации полученных металлов составит:

- никель при цене 27,5 тыс. долл. за 1 т — 1486,65 долл.
- медь при цене 7 тыс. долл. за 1 т — 86,63 долл.
- кобальт при цене 92 тыс. долл. за 1 т — 124,2 долл.

Итого: 1697,48 долл.

Себестоимость переработки пирротинового концентрата по схеме выщелачивание — электролиз составит около 200 долл. за 1 т. Чистая прибыль от переработки 1 т концентрата составит около 1497,48 долл. При производительности 100 т/сут. по концентрату (33 тыс. т в год) прибыль составит 49 млн. 416 тыс. долл. в год.

Однако более перспективной и экономически более выгодной является двухстадийная бактериально-химическая технология, разрабатываемая в настоящее время в ИНМИ РАН с использованием медных и медно-цинковых руд. Эта технология была также апробирована на образце медно-никелевых руд, предоставленном Норильской обогатительной фабрикой, и на руде и концентратах месторождения Шануч.

Известно, что микробные культуры могут окислять нерастворимые сульфиды прямым или косвенным путями. При прямом окислении разрушение кристаллической структуры сульфидного минерала происходит за счет воздействия ферментных систем живых микроорганизмов. Косвенное окисление сульфидных минералов связано с действием ионов трехвалентного железа, которое, в свою очередь, является продуктом микробного окисления соединения двухвалентного железа и железосодержащих сульфидных минералов. Сульфиды меди или цинка более активно окисляются трехвалентным железом, чем бактериями. В присутствии Fe^{3+} роль бактерий в окислении сульфидных минералов заключается, в основном, в окислении Fe^{2+} , то есть в регенерации окислителя, и в окислении элементарной серы, пассивирующей частицы руды или концентрата и препятствующей окислению субстрата.

Двухстадийная бактериально-химическая технология переработки промпродукта предполагает на первой стадии выщелачивание металлов под действием трехвалентного железа. При этом плотность пульпы может быть намного выше, чем в традиционной чановой биогидрометаллургической технологии, а температура процесса — до 80 °С, что намного повышает его скорость. На второй стадии осуществляется регенерация трехвалентного железа, которое восстанавливается до двухвалентного при его взаимодействии с сульфидными минералами на первой стадии. Процесс регенерации ведется разными сообществами микроорганизмов в за-

висимости от температурного режима на первой стадии процесса.

Двухстадийная технология бактериально-химического выщелачивания была испытана на Учалинском медно-цинковом промпродукте с содержанием 16,7% цинка и 1,3% меди. Первая стадия проводилась раствором железа при температуре 75 °С и концентрации твердой фазы 34%. На второй стадии была использована мезофильная культура бактерий. За 30 часов процесса в непрерывных условиях на лабораторной опытной установке при температуре 30 °С на второй стадии в раствор было извлечено 91% цинка и 61% меди. При использовании умеренно термофильных бактерий на второй стадии при температуре процесса 55 °С за 24 часа извлечение цинка в раствор составило 92%, меди — 62%. Время выщелачивания сокращается в 4–5 раз при использовании к тому же более плотной пульпы ($t:j=1:2$ — $1:1$) по сравнению с плотностью пульпы ($t:j=1:5$) в традиционной биогидрометаллургической технологии.

Двухстадийная схема обработки апробирована для выщелачивания никеля, кобальта и меди из медно-никелевой руды месторождения Шануч. Основными сульфидными минералами руды являются пирротин, пентландит, халькопирит, пирит и минералы группы виоларита. Показана тонкая вкрапленность и изоморфное замещение металлов в структуре основных минералов руды. В составе пирротинового концентрата руды, полученного при магнитном обогащении, содержится 6,2% никеля, 1,1% меди, 0,16% кобальта. Выход пирротинового концентрата — 48,9%. Двухстадийная схема обработки на первом этапе включала в себя наработку выщелачивающего раствора трехвалентного железа при помощи микроорганизмов, а на втором этапе — обработку сырья бактериальным раствором трехвалентного железа при повышенной температуре. Для получения бактериального раствора использовали аборигенный штамм *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ТФКм), выделенный из проб медно-никелевой руды месторождения Шануч Камчатской никеленосной провинции. В результате бактериально-химического выщелачивания цветных металлов из пирротинового концентрата за 48 ч выход металлов в раствор составил 95% Ni, 85% Cu, 92% Co. При этом окисление пирротина составило 100%.

Предложенный способ обработки может быть перспективным и рентабельным для переработки сульфидных руд и пирротиновых хвостов, содержащих никель и позволит за значительно меньший период времени, по сравнению с традиционными биогидрометаллургическими технологиями, с соблюдением экологических

требований и снижением экономическим затрат провести максимальное селективное окисление медно-никелевого сырья.

Пирротиновый концентрат Норильской обогатительной фабрики содержит 3,7% никеля, 1,23% меди, 0,144% кобальта, 25,02% серы и 44,75% железа, а также золото, серебро, платину и палладий.

В лабораторных условиях на камеральной установке была испытана технология бактериально-химического выщелачивания, состоящая из двух циклов: стадии химического выщелачивания и стадии биовыщелачивания. В результате проведенных испытаний в раствор из пирротинового концентрата было переведено 98% никеля, 85% кобальта и 90% меди за 24 часа непрерывного процесса.

На основании проведенных исследований для переработки сложных никель-медно-кобальтовых продуктов была разработана принципиальная технологическая схема с применением двухстадийного бактериально-химического выщелачивания (рис. 7).



Рис. 7. Принципиальная технологическая схема с применением двухстадийного бактериально-химического выщелачивания

При этом на первой стадии концентрат обрабатывается серной кислотой для удаления легкорастворимых пирротинов. На втором цикле химической обработки концентрат выщелачивается сульфатом трехвалентного железа (2), при котором ионы Fe^{3+} восстанавливаются до Fe^{2+} . На стадии химического выщелачивания в раствор переходит до 78% Ni, 59% Cu и 71% Co. Далее пульпа направляется на стадию биовыщелачивания (3), которая ведется ассоциацией хемолитотрофных термофильных бактерий. На этой стадии осуществляется полное выще-

лачивание (на 90–95%) Ni, Cu и Co, а также вскрытие золота и серебра, вкрапленного в сульфидные минералы, что позволяет практически полностью извлечь их последующим цианированием. На этой стадии происходит также полная регенерация ионов Fe^{3+} с образованием раствора сульфата трехвалентного железа $Fe_2(SO_4)_3$. Далее пульпа поступает на сгущение (4), откуда раствор сульфата железа направляется на второй цикл стадии химического выщелачивания, а осадок — на выделение благородных металлов.

Для выделения цветных металлов отбирается часть пульпы перед стадией биовыщелачивания и направляется на сгущение (5), откуда осадок поступает на биовыщелачивание, а раствор — на выделение Ni, Cu и Co. Для последующего электролиза цветных металлов необходимо получить чистые и достаточно концентрированные растворы их сульфатов. Одним из перспективных способов выделения цветных металлов из растворов сульфатов может быть их селективная экстракция. Чистые металлы при этом получают с помощью электролиза. Отработанные растворы серной кислоты после электролиза возвращаются в первый цикл химического выщелачивания.

Выбор конкретных наиболее подходящих способов получения товарных продуктов из раствора после выщелачивания руды целесообразно проводить, учитывая конкретные условия переработки руды на предприятии. Представленный вариант технологической схемы переработки показывает, что основные технологические потоки в ней замкнуты, сточные воды и газовые выбросы отсутствуют. Единственным отходом в ней является осадок после биовыщелачивания, состоящий в основном из пустой породы и сульфата железа — ярозита, который нетоксичен и может быть использован после нейтрализации известью в составе дорожных покрытий. Из всех возможных вариантов переработки руды представленный вариант является наиболее экологически чистым.

Расчет экономической эффективности

При эффективности извлечения металлов по представленной технологии (до получения катодных металлов): никеля — 85%, меди — 75%, кобальта — 50% количество никеля из 1 т руды составит 31,45 кг, меди — 9,23 кг, кобальта — 0,07 кг. Прибыль от реализации полученных металлов составит:

- никель при цене 27,5 тыс. долл. за 1 т — 864,9 долл.
 - медь при цене 7 тыс. долл. за 1 т — 64,61 долл.
 - кобальт при цене 92 тыс. долл. за 1 т — 6,44 долл.
- Итого: 935,95 долл.

Себестоимость переработки пирротинового концентрата по схеме выщелачивание — электролиз составит около 200 долл. за 1 т. Чистая прибыль от переработки 1 т концентрата составит около 736 долл. При производительности 100 т/сут по концентрату (33 тыс. т в год) прибыль составит 24 млн. 288 тыс. долл. в год. В таблице 5 приведен расчет капитальных затрат для реализации двухстадийного биовыщелачивания на установке мощностью 100 т/сут.

Таблица 5

Оценка капитальных затрат при переработке никель-медно-кобальтовых продуктов на установке двухстадийного биовыщелачивания мощностью 100 т/сут. с последующим получением никеля, меди и кобальта электролизом

№ п/п	Основные статьи затрат	Стоимость, млн. долл.
I.	Ориентировочная стоимость основного оборудования	4,07
I.1	Реакторы для первой стадии выщелачивания с интенсивным перемешиванием	1,2
I.2	Биореакторы для второй стадии выщелачивания с аэрацией и перемешиванием	1,8
I.3	Отстойники	0,1
I.4	Электролизеры	0,5
I.5	Реакторы для экстракции-реэкстракции	0,2
I.6	Теплообменник	0,16
I.7	Сборники	0,11
II.	Стоимость технологического оборудования (С1)	2,03
II.1	Трубопроводы (0,15 С1)	0,61
II.2	Клапаны, арматура, КИПиА (0,2 С1)	0,81
II.3	Реагентное хозяйство (0,15 С1)	0,61
III.	Монтаж и пусконаладка	3,0
IV.	Капитальное строительство	5,5
Всего:	Капитальные затраты	14,6

Анализ представленных результатов показывает, что при переработке пирротинового концентрата Норильской обогатительной фабрики чистая прибыль (без учета налогов) составит более 24 млн. долл. в год,

а срок окупаемости при приведенных капитальных затратах — примерно 7 месяцев, тогда как при переработке более богатого продукта — руды месторождения Шануч прибыль составит более 49 млн. долл. в год, а срок окупаемости — около 4 месяцев.

Заключение

Разработкой процессов микробиологического выщелачивания занимаются более 100 фирм в 25 странах. Промышленные установки бактериального выщелачивания золотомышьяковых концентратов работают во многих странах (ЮАР, Австралия, Бразилия, Гана, США, Канада, Россия). Опыт эксплуатации этих установок показал высокую эффективность и экономичность процесса. По некоторым данным, капитальные затраты на бактериальное выщелачивание в 2 раза ниже по сравнению с обжигом и в 2,5 раза ниже по сравнению с автоклавным выщелачиванием. Извлечение золота по бактериальной технологии выше по сравнению с традиционной на 15–20%.

Преимущество биотехнологического метода по сравнению с пирометаллургическими и автоклавными подтверждено интенсивным внедрением биогидрометаллургических технологий при получении золота из золотомышьякового сырья. В мировой практике работает более 15 промышленных предприятий. Задача настоящего времени — создание конкурентоспособного, ресурсосберегающего и экологически чистого производства извлечения цветных металлов с применением бактериального выщелачивания. Международные компании Генкор (ЮАР), Лонро (Англия) и др. ведут активные разработки технологий для извлечения цветных металлов с применением бактериального выщелачивания. Однако пока ни за рубежом, ни в России промышленных установок чанового выщелачивания нет.

Приводимый ниже библиографический список содержит основные литературные источники, использованные в работе.

Литература

1. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. *Sulfobacillus* — новый род термофильных спорообразующих бактерий // Микробиология. — 1978. — Т. 47. — № 5. — С. 815–822.
2. Головачева Р. С., Голышина О.В., Каравайко Г.И., Дорофеев А.Г., Пивоварова Т.А., Черных Н. А. Новая железокисляющая бактерия *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. // Микробиология. — 1992. — Т. 61. — № 6. — С. 1056–1065.

3. Коваленко Е.В., Малахова П.Т. Спорообразующая железозоокисляющая бактерия *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* // Микробиология. — 1983. — Т. 52. — С. 962–966.
4. Лодейщиков В.В. Технология извлечения золота и серебра из упорных руд. — Иркутск: ОАО «Иргиредмет», 1999.
5. Маркосян Г.Е. Новая железозоокисляющая бактерия — *Leptospirillum ferrooxidans* // Биол. журнал Армении. — 1972. — Т. 35. — № 2. — С. 26.
6. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А., Турова Т.П., Колганова Т.В., Осипов Г.А., Лысенко А.М., Кондратьева Т.Ф., Каравайко Г.И. Новая термофильная бактерия *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov. // Микробиология. — 2003. — Т. 72. — № 5. — С. 681–688.
7. Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrat'eva T.F., Duda V.I., Suzina N.E., Melamud V.S., Tourova T.P., Karavaiko G.I. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006. — Vol. 56. — P. 1036–1042.
8. Brierley C.L. *Bacterial oxidation*. // Engineering and Mining Journal. — 1995. — Vol. 196. — P. 42–45.
9. Brierley J.A., Brierley C.L. Present and Future Commercial Applications of Biohydrometallurgy // Hydrometallurgy. — 2001. — Vol. 59. — P. 233–239.
10. Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T., Weiss R.L. *Sulfolobus*: a new genes of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature // Arch. Mikrobiol. — 1972. — Vol. 84. — P. 54–68.
11. Colmer A.R., Hinkle M.E. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report // Science. — 1947 — Vol. 106. — N 2751. — P. 253–256.
12. Coram N.J. and Rawlings D.E. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol. 68. — N 2. — P. 838–845.
13. Corrans I.J., Johnson G.D., Angove J.E. The recovery nickel and gold from sulphide concentrates / XVIII. Int. Mineral Processing Congress, Sydney. 1993.
14. Dopsan M., Baker-Austin C., Hind A., Bowman J.P., Bond P.L. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70. — N 4. — P. 2079–2088.
15. Dreisinger D., Richmond G., Hess F. and Lancaster T. The Competitive Position of the Mt. Gordon Copper Process in the Copper Industry, Presented at the Alta Copper Symposium, Perth, Australia, 2002.
16. Dresher W.H. Producing Copper Nature's Way: Bioleaching / Copper Development Association. May 2004.
17. Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. // Int. J. System. Bacteriol. — 1996. — Vol. 46. — N 4. — P. 1056–1054.
18. Fernando A. Present and future of bioleaching in developing countries. // Electronic J. of Biotechnology. — 2002. — Vol. 5. — N 2. Issue of August 15.
19. Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S., Stettler K.O. *Metallosphaera prunaea*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic Archaeum, isolated from a uranium mine in Germany // Syst. Appl. Microbiol. — 1995. — Vol. 18. — P. 560–566.
20. Fuchs T., Huber H., Burggraf S., Stettler K.O. 16SrDNA-based phylogeny of the archaeal order Sulfolobales and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov. // Syst. Appl. Microbiol. — 1996. — Vol. 19. — P. 56–60.
21. Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondratyeva T.F., Moore E.R.B., Abraham W-R., Lunsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golishin P.N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferropasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2000. — Vol. 50. — P. 997–1006.
22. Grogan D., Palm P., Zillig W. Isolate B12, which harbours a virus-like element, represents a new species of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov. // Arch. Microbiol. — 1990. — Vol. 154. — N 6. — P. 594–599.
23. Hallberg K.B., Lindstrom E.B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile // Microbiology (UK). — 1994. — Vol. 140. — P. 3451–3456.
24. Hawkes R.B., Franzmann P.D., O'hara G., Plumb J.J. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap // Extremophiles. — 2006. — Vol. 10. — N 6. — P. 525–530.
25. He Z.G., Zhong H., Li Y. *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring // Curr. Microbiol. — 2004. — Vol. 48. — N 2. — P. 159–163.
26. Hippe H. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2000. — Vol. 50. — N 2. — P. 501–503.
27. Huber G., Sprinler C., Gambacorta A., Stetter K.O. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. Represents a New Genus of Aerobic, Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archaeobacteria // System. Appl. Microbiol. — 1989. — Vol. 12. — P. 38–47.

28. Huber G., Stetter K.O. *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1991. – Vol. 14. – P. 372–378.
29. Jan R.L., Wu J., Chaw S.M., Tsai C.W., Tsen S.D. A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1999. – N 4. – P. 1809–1816.
30. Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P., Kondrat'eva T.F., Tsaplina I.A., Egorova M.A., Krasil'nikova E.N., Zakharchuk L.M. Reclassification of 'Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. thermotolerans' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – N 2. – P. 941–947.
31. Kelly D.P., Wood A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – Vol. 50. – P. 511–516.
32. Kurosawa N., Itoh Y.H. and Itoh T. Reclassification of *Sulfolobus hakonensis* Takayanagi et al. 1996 as *Metallosphaera hakonensis* comb. nov. based on phylogenetic evidence and DNA G+C content // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53. – N 5. – P. 1607–1608.
33. Lawrence R.W. Biooxidation for the treatment of refractory gold ores and concentrates // Canadian perspective. *CIM Bulletin.* – 1994. – N 87. – P. 58–65.
34. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. // *Microbiology.* – 1996. – Vol. 142. – P. 775–783.
35. Peacey J., Jian Guo X., Robles E. Copper Hydrometallurgy – Current Status. Preliminary Economics, Future Direction and Positioning versus Smelting, 2003.
36. Riekkola-Vanhanen M. Talvivaara black schist bioheap leaching demonstration plant / Biohydrometallurgy: From the single cell environment. *Proc. of the 17th International Biohydrometallurgy Symposium.* Eds. A. Schippers, W. Sand, F. Glombitza, S. Willscher. Switzerland: Trans Tech Publications LTD, – 2007 – P. 30–33.
37. Segerer A., Neuner A., Kristjansson J. K., Stetter K.O. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1986. – Vol. 36. – N 4. – P. 559–564.
38. Suzuki T., Iwasaki T., Uzawa T., Hara K., Nemoto N., Kon T., Ueki T., Yamagishi A. and Oshima T. *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan // *Extremophiles.* – 2002. – N 1. – P. 39–44.
39. Takayanagi S., Kawasaki H., Sugimori K., Yamada T., Sugai A., Ito T., Yamasato K. and Shioda M. *Sulfolobus hakonensis* sp. nov., a novel species of acidothermophilic archaeon // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 46. – N 2. – P. 377–382.
40. Tyson C.W., Lo I., Baker B.J., Allen E.E., Hugenholtz P. and Banfield J.F. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – N 10. – P. 6319–6324.
41. Waksman S.A., Joffe I. S. Microorganisms concerned with the oxidation of sulfur in soil. II *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur oxidizing isolated from the soil // *J. Bacteriol.* – 1922. – Vol. 7. – N 2. – P. 239–256.
42. Xiang X., Dong X. and Huang L. *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China // *Extremophiles.* – 2003. – Vol. 7. – N 6. – P. 493–498.
43. Yoshida N., Nakasato M., Ohmura N., Ando A., Saiki H., Ishii M., Igarashi Y. *Acidianus manzaensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon growing autotrophically by the oxidation of H₂ with the reduction of Fe³⁺ // *Curr. Microbiol.* – 2006. – Vol. 53 – N 5. – P. 406–411.
44. Zillig W., Stetter K.O., Wunderl S., Schulz W., Priess H., Scholz I. The *Sulfolobus*-“*Caldariella*” group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases // *Arch. Microbiol.* – 1980. – Vol. 125. – P. 259–269.
45. Zillig W., Yeats S., Holz I., Bock A., Rettenberger M., Gropp F., and Simon G. *Desulfurolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur // *System. Appl. Microbiol.* – 1986. – Vol. 8. – P. 197–203.

Материалы доклада на Всероссийском совещании работников биотехнологической отрасли промышленности, Москва, 2 декабря 2008 г.

BIOGEOLOGICAL OBTAIN NOBLE AND NON-FERROUS METALS: STATUS AND PROSPECTS

T.F. KONDRATYEVA

S.N. Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow

К 75-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ Х. ТЕМИНА – ИССЛЕДОВАТЕЛЯ, ОТКРЫВШЕГО ОБРАТНУЮ ТРАНСКРИПЦИЮ

В.С. ВОРОБЬЕВ*, О.В. ВОРОБЬЕВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



В истории науки периодически случаются открытия, которые поражают своей неожиданностью. Обычно принято в таких случаях говорить о Копернике, Лобачевском, Эйнштейне и т.д. В молекулярной биологии и химии всех удивил Х. Темин в 1970 году, открыв обратную транскрипцию от РНК к ДНК, что противоречило центральной догме молекулярной биологии.

В 2009 году Х. Темину исполнилось бы 75 лет, однако он умер в 59 лет (это случилось 15 лет назад, в 1994 году), не дожив до такого нередкого для ученых юбилея. Журнал откликается на эту дату и помещает настоящую статью.

Хоуард Мартин Темин родился 10 декабря 1934 года в Филадельфии (США) в семье юриста. В уче-

нические годы посещал летнюю школу для одаренных детей при Джексоновской мемориальной лаборатории в Бар-Харборе (штат Мэн). В 1951–1953 гг. проходил обучение в Свортмор-колледже, где ему предоставилась возможность углубленного знакомства с биологией. С 1953 по 1955 гг. Темин работал в Институте исследований рака в Филадельфии, где получил степень бакалавра наук по биологии.

Он напечатал свою первую научную работу в 18 лет. Уже по окончании колледжа ему прочили блестящее будущее в экспериментальной биологии.

Решающее значение в его научной биографии явился переход на работу в прославленный Калифорнийский технологический институт («Калтех») в Пасадене. Там он сначала занимался экспериментальной эмбриологией, а затем через полтора года перешел в лабораторию Ренато Дульбекко (будущего Нобелевского лауреата, разделившего премию с Теминым и Балтимором), где переключился на вирусологическую тематику, принесшую ему впоследствии славу и известность.

Важно, что в это время он мог общаться, кроме Дульбекко, и с такими учителями, как Макс Дельбрюк, широко внедрявшим количественные методы в биологию, как М. Мезельсон и другие представители знаменитой «фаговой группы». Докторская диссертация Темина была посвящена вирусу саркомы Рауса. Во время ее выполнения он активно сотрудничал с доктором Г. Рубиным и напечатал несколько совместных статей.

В 1960 году ученый был назначен доцентом по онкологии в Висконсинском университете и стал работать в лаборатории исследования рака Мак-Ардля (она же — кафедра онкологии) медицинской школы. Позднее он получил должность адъюнкт-профессора. Здесь он в 1971 г. стал профессором Общества исследователей выпускников Висконсинского университета, в 1980 г. был избран профессором онкологии, а в 1982 г. — профессором биологии.

* Автор для переписки:

© 2008 г. Воробьев Вадим Сергеевич,
к.м.н., член Центрального Правления
Общества биотехнологов России
им. Ю.А. Овчинникова
119071 Москва, Ленинский пр-т, 33
E-mail: obr@biorosinfo.ru

Сосредоточенная, целеустремленная работа Темина в области вирусологии принесла в конце концов крайне ценные плоды. Причем, как отмечает он в автобиографии, эксперименты проводились в подвале (что лишний раз подтверждает распространенный афоризм — «настоящая наука делается в подвалах»). Это было в период с 1960-го по 1964-й год — год окончательного формулирования гипотезы ДНК-провируса (с 1959—1960 гг. она была рабочей идеей), когда вся кафедра онкологии переехала в новое здание.

Еще в период изучения вируса саркомы Рауса Теминым был разработан количественный метод определения роста вирусов. С его помощью он смог выявлять различия между нормальными и опухолевыми клетками. Кроме того, его основной объект — вирус саркомы Рауса — является РНК-содержащим вирусом. Как все это можно было соотнести с классическими работами Эйвери и Херши о генетической роли ДНК и решить вопрос о том, как РНК вируса саркомы Рауса интегрируется с клеточной ДНК?

В 1960 году он выдвинул гипотезу ДНК-провируса, согласно которой белковая оболочка некоторых вирусов содержит фермент, катализирующий или облегчающий копирование вирусных генов в ДНК клетки-хозяина. На очереди встала проблема доказательства существования такого фермента.

Следует отметить, что свою гипотезу ДНК-провируса Темин широко обнародовал в 1964 году на конференции [14], однако научное сообщество встретило ее с недоверием или молчаливым неприятием, а ряд научных лидеров открыто выступил с критикой, иногда с оттенком иронии и сарказма. Еще бы — молодой автор выступил против общепризнанной «центральной догмы» в биологии: не ДНК — РНК — белок, а наоборот, поставив первой РНК. Понадобилось еще 6 лет упорного труда, чтобы доказать правомерность выдвинутой гипотезы.

В 1970 году Х. Темин и Д. Балтимор независимо друг от друга выделили указанный фермент, который копировал РНК-гены в клеточную ДНК. Первоначально Х. Темин со своей коллегой и соавтором С. Мизутани дали ему наименование «endogenous RNA-directed DNA polymerase» [15]. Затем при публикации фермент был назван «РНК-зависимая ДНК-полимераза» (позднее он получил название «обратная транскриптаза», или «ревертаза»). Следовательно, были представлены четкие доказательства того, что фермент осуществляет синтез ДНК на матрице вирусной РНК. Интересно, что Темин сообщил о своем открытии на X Между-

народном конгрессе Международного союза борьбы с раком в мае 1970 г., а затем Балтимор выступил на симпозиуме в Колд-Спринг-Харборе. Результаты были сразу напечатаны обоими авторами (Балтимором и Теминым) в одном и том же июньском номере 1970 г. журнала «Nature» в виде отдельных статей [5, 19]. Несколько позднее они выступили и с общей публикацией на данную тему [17]. Надо сказать, что все оппоненты обратной транскрипции тут же смолкли, в том числе и наиболее нетерпимый критик этого С. Шпигельман, директор Научно-исследовательского института рака Колумбийского университета, который повторил опыты с положительным результатом. Вскоре уже весь мир занялся обратной транскрипцией.

Так было совершено одно из выдающихся открытий в молекулярной биологии, которое высветило очередную тайну мироздания, а авторам принесло признание Нобелевского комитета. Премия была вручена Темину и Балтимору в 1975 году вместе с Р. Дульбекко с формулировкой: «За открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом клетки». В своей Нобелевской лекции «Гипотеза ДНК-провируса» Х. Темин сообщил об истории открытия, его фоне и предшествующей работе [15] — об этом он рассказал и в других статьях [16]. Дольщик по премии Д. Балтимор расширил общую картину в своей лекции «Вирусы, полимеразы и рак», сообщив о собственном вкладе в решение проблемы [6].

Вот еще один пример того, как уникальный объект — РНК-содержащий вирус саркомы Рауса, — попавший в поле зрения талантливого непредвзятого исследователя, сыграл ключевую роль в постановке и решении одной из кардинальных задач молекулярной генетики — возможности обратной транскрипции.

Надо подчеркнуть, что Ф. Крик, видя революционность открытия Темина и Балтимора и стремление некоторых исследователей поколебать фундаментальность центральной догмы молекулярной биологии, немедленно напечатал статью «Central dogma of molecular biology» в августовском номере «Nature» за 1970 год [9]. В ней он отстаивает незыблемость этой теории, в создание которой он внес существенный вклад, независимо от недавно доказанного принципа обратной транскрипции.

Кроме работ по обратной транскриптазе, Темин изучал вопрос о трансформации нормальной клетки в опухолевую под влиянием провирусов. Он продемонстрировал, что активированный ген провируса может вызывать синтез опухолепродукующих белков в клетке. Тем не менее он сомневался в ключевой роли вирусов в

онкогенезе у человека и больше склонялся к идее генетических мутаций в клетках под влиянием ряда факторов — химических, физических агентов, вирусов. Особенно он был непримирим в отношении курения. Кстати, в речи на банкете по случаю присуждения Нобелевской премии 10 декабря 1975 года Темин упомянул о прекращении курения как факторе профилактики рака, что вызвало общественный резонанс [12].

Таким образом, исследования Темина стали важной вехой как в онкологии, так и общей биологии. Особенно необходимо указать на то, что открытие обратной транскрипции стало методической основой промышленной биотехнологии. Известно, что без метода комплементарной ДНК невозможно клонировать такое количество генов, которым располагает современная биоиндустрия. Целая ветвь от открытия Темина — Балтимора привела к разработке проблемы ретровирусов и соответственно таких нозологий, как СПИД, некоторые формы рака, гепатит В.

Естественно, ученый был оценен и в общественном плане. Он был удостоен премии Уоррена (совместно с Д. Балтимором), награды Американского Фонда Стила по молекулярной биологии (1972), премии Альберта Ласкера за фундаментальные медицинские исследования (1974), Национальной научной медали США (1992) и др. Темин был членом Американской академии наук и искусств, Национальной академии наук США, Американского общества микробиологов, Американской научно-исследовательской онкологической ассоциации, Американского вирусологического общества и т.д.

Х. Темин был женат на Рейле Гринберг, по специальности — популяционный генетик. У них родились две дочери. Он умер 9 февраля 1994 года от онкологического заболевания.

Биографические сведения об ученом имеются в Нобелевских документах (в том числе его краткой автобиографии), воспоминаниях о нем [4, 7, 8, 11, 18] и публикациях на русском языке [1, 2].

Хорошая подборка его трудов (55) приведена в исследовании В. Sugden [10] (www.nar.edu/html/biomems/htemin.html). С полным списком работ Х. Темина можно познакомиться через PubMed (219 статей), а также на сайтах www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=pubmed&term=Temin%20HM%5Bau%5D&dispmax=50 и www.labmeeting.com/papers/author/temin-hm (на последнем имеются около 30 работ 1991–1998 гг.). В списке обращает на себя внимание статья ученого: Temin H.M. Moscow diary //

The Sciences (NY). — 1977. — Vol. 17(4). — P. 26–27 [13]. Речь идет о московском дневнике 1977 года! Кроме того, имеется статья Темина с соавт. о Международном генетическом конгрессе в Москве в августе 1978 года [3]. Эти интересные факты, возможно, могут заинтересовать историков науки.

Литература

1. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия: М — Я. Пер. с англ. — М.: Прогресс, 1992. — С. 477–479.
2. Марьянович А.Т., Князькин Н.В. Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002. — СПб.: Издательство ДЕАН, 2003. — С. 124–131.
3. Adelstein R.S., Pershan P.S., Ptashne M., Fink G., Temin H.M., Hershey A.D., Caspari E., Yanovsky C., Rhoades M.M., Owen R.D., Fresco J., Henderson A.S. Moscow Genetic Congress // Science. — 1978 Aug 25. — Vol. 201(4357). — P. 675.
4. Altman L.K. Dr. H.M. Temin, 59, Cancer Research Laureate, Die // The New York Times. — 1994. February 11.
5. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase // Nature. — 1970 Jun 27. — Vol. 226(5252). — P. 1209–1211.
6. Baltimore D. Viruses, polymerases and cancer. Nobel lecture. 1975 / In: Les Prix Nobel en 1975. — Stockholm, 1976.
7. Baltimore D. Thinking about Howard Temin // Genes Dev. — 1995. — Vol. 9. — P. 1303–1307.
8. Cooper G.M., R.G. Temin, and B. Sugden (eds). The DNA Provirus: Howard Temin's Scientific Legacy. — ASM Press, 1995. — 356 p.
9. Crick F. Central dogma of molecular biology // Nature. — 1970 Aug 8. — Vol. 227. — P. 561–563.
10. Sugden B. Howard M. Temin, December 10, 1934–February 9, 1994 // Biographical Memoirs. — 2001. — Vol. 79. — P. 336–375.
11. Temin H.M. Autobiography. Nobel prize laureates in physiology and medicine. 1975 / In: Les Prix Nobel en 1975. — Stockholm, 1976.
12. Temin H.M. Banquet speech. Nobel prize laureates in physiology and medicine. 1975 / In: Les Prix Nobel en 1975. — Stockholm, 1976.
13. Temin H.M. Moscow diary // The Sciences (NY). — 1977. — Vol. 17(4). — P. 26–27.
14. Temin H.M. Nature of the provirus of Rous sarcoma // Nat. Cancer Inst. Monograph 17. Avian Tumor Viruses. — 1964. — P. 557–570.
15. Temin H.M. The DNA provirus hypothesis. Nobel lecture. 1975 / In: Les Prix Nobel en 1975. — Stockholm, 1976.
16. Temin H.M. The DNA provirus hypothesis // Science. — 1976 June. — Vol. 192(4244). — P. 1075–1080.

17. *Temin H.M. and Baltimore D.* RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses / In: *Advances in Virus Research*. Vol. 17. Smith K.M., Lauffer M.A. and Bang F.B. (eds). – Academic Press, New York and London, 1972. – P. 129–186.
18. *Temin H.M., Cooper G.M., R. Greenberg Temin, Sugden B.* The DNA provirus: Howard Temin's scientific legacy / Howard Temin Commemorative Symposium. – ASM Press, 1995. – 324 p.
19. *Temin H.M. and Mizutani S.* RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus // *Nature*. – 1970 Jun 27. – Vol. 226(5252). – P. 1211–1213.
- Интернет-источники:
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1975/temin-lecture.pdf
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1975/temin-autobio.html
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1975/temin-speech.html
www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=pubmed&term=Temin%20HM%5Bau%5D&dispmax=50
www.labmeeting.com/papers/author/temin-hm
www.nap.edu/html/biomems/htemin.html

Резюме. Статья посвящена 75-летней годовщине со дня рождения Х. Темина (1934–1994), выдающегося молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии.

Ключевые слова: история науки, молекулярная биология, обратная транскриптаза, биография, Хоуард Мартин Темин.

TO 75th ANNIVERSARY FROM BIRTHDAY OF H. TEMIN, A DISCOVERER OF REVERSE TRANSCRIPTION

V.S. VOROBYEV, O.V. VOROBYEVA

Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

The memorial article devoted to 75th anniversary from birthday of H. Temin (1934–1994), an outstanding molecular biologist, Nobel prize winner, was presented.

Keywords: science history, molecular biology, reverse transcriptase, biographies, Howard Martin Temin.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2009 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1809 — сформулирована первая теория биологической эволюции (Ламарк Ж.Б. в книге «Философия зоологии»).

1809 — изобретение способа остановки развития (размножения) микроорганизмов в пищевых и иных продуктах, то есть консервирования (Appert Nicolas, 1749–1841).

1839 — введение термина «протоплазма» для обозначения содержимого клетки (Пуркинье Я., 1787–1869).

1839 — теория катализа Ю. Либиха («гипотеза молекулярных ударов»).

1859 — 150 лет публикации книги Дарвина «Происхождение видов путем естественного отбора»

1859 — разработка метода спектрального анализа (Бунзен Р.В. и Кирхгоф Г.Р.).

1864 — выдвижение Л. Пастером теории гниения организмов за счет «корпускул» или «микробов» в воздухе.

1869 — открытие периодического закона Д.И. Менделеева.

1874 — основание стереохимии (Вант-Гофф Я.Х.).

1879 — немецкий физиолог А. Коссель начал изучение нуклеина (обнаруженного Ф. Мишером в 1868 г.), что привело к открытию нуклеиновых кислот.

1884 — создание Пастером вакцины от бешенства.

1884 — гипотеза о роли ядра как носителя наследственности (Гертвиг О., Страсбургер Э.).

1889 — Гуго де Фриз постулировал, что «наследование специфических черт организма осуществляется через частицы», назвав последние «(пан)генами».

1889 — Рихардом Альтманом (1852–1901) предложен термин «нуклеиновые кислоты»; он же разработал первый удобный и общий способ выделения нуклеиновых кислот, свободных от белковых примесей.

1894 — выход в свет книги У. Бэтсона «Материалы по изучению прерывистой изменчивости в происхождении видов» (W. Watson. Materials for the study of variation treated with especial regard for the discontinuity in the origin of the species. Cambridge: University Press, 1894, 609 p.), в которой он изложил свою теорию прерывистой изменчивости.

1899 — открытие бактериофагов (Гамалея Н.Ф.).

1904 — У. Бэтсон предложил понятие «сцепление генов».

1909 — введение термина «ген» (Йогансен В., 1857–1927). Ученый представил его в своей книге «Элементы точного учения о наследственности» (Wilhelm Johannsen. Elemente der exakten Erblchkeitslehre. Gustav Fischer, Jena, 1909). Им же ранее были предложены термины «генотип» и «фенотип».

1909 — Левин Фибус (Ph. A. Th. Levene, 1869–1940; ученик И.П. Павлова, впоследствии жил и работал в США, в Рокфеллеровском институте Нью-Йорка) показал, что в состав нуклеиновых кислот входят гуанин, аденин, урацил, цитозин.

1919 — публикация венгерским инженером Карлом Эреки (1878–1952) книги на немецком языке в Берлине: Karl Ereky. Biotechnologie der Fleisch-, Fett- und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe. Verlag Paul Parey, Berlin, 1919. VII, 84 S. («Биотехнология производства мяса, жира и молока на крупной сельскохозяйственной ферме»).

1929 — обнаружение дезоксирибозы (Левин Ф.).

1929 — публикация работы А. Флеминга об открытии пенициллина: Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

to their use in the isolation of *B. influenza* // *Br. J. Exp. Pathol.* — 1929. — Vol. 10. — P. 226–236.

1934 — английский физик Джон Десмонд Бернал и Дороти Кроуфут (Ходжкин) — будущий лауреат Нобелевской премии по химии 1964 года — представили первую рентгенограмму белка (кристаллы фермента пепсина).

1934 — открытие фенилкетонурии норвежским врачом И.А. Фелингом.

1939 — начало экспериментов А.Н. Белозерского, доказавших наличие ДНК и РНК в бактериях.

1939 — создание первого просвечивающего электронного микроскопа (Сименс).

1944 — публикация результатов экспериментов О. Эйвери с коллегами о наследственном материале, вызывающем трансформацию бактерий, с доказательством того, что ДНК является носителем генетической информации: Avery O.T., MacLeod C.M., and McCarty M. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III* // *Journal of Experimental Medicine.* — 1944. — Vol. 79. — P. 137–158.

1944 — открытие транспозируемых генетических элементов Барбарой Мак-Клинток (Нобелевская премия 1983 г.).

1944 — выход в свет книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» (E. Schroedinger. *What is life?* Cambridge University Press, 1944).

1944 — Сенгер Ф. применил метод хроматографии для определения аминокислотной последовательности белка инсулина.

1949 — А. Сент-Дьердьи показал, что изолированные миофибриллы сокращаются при добавлении АТФ.

1949 — Л. Полинг обнаружил, что серповидно-клеточная анемия вызывается наличием в эритроцитах дефектного гемоглобина (начало учения о молекулярных болезнях человека).

1954 — публикация статьи Г. Гамова, в которой впервые выдвигается идея триплетности генетического кода: Gamov G. *Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures* // *Nature.* — 1954. — Vol. 173. — P. 318. Он полагал, что для кодирования информации четырьмя азотистыми основаниями для синтеза 20 аминокислот потребуется язык из трех букв (исходной аналогией у него были четыре масти карт): «при сочетании 4 нуклеотидов тройками получаются 64 различные комбинации», чего, по его мнению, вполне достаточно «для записи наследственной информации».

1959 — присуждение Нобелевской премии С. Очоа и А. Корнбергу.

1959 — Ф. Жакоб и Ж. Моно впервые установили факт существования механизма регуляции генов. Ими предложены термины «репрессор» и «оперон».

1959 — введение в лабораторную практику полиакриламидного геля (Рэймонд С.).

1959 — основание Института химии природных соединений АН СССР (ныне — Институт биохимической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

1964 — Х. Темин (1934–1994) предложил гипотезу ДНК-провируса, предположив таким образом возможность обратной транскрипции: от РНК к ДНК.

1964 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине К. Блоку (1912–2002) и Ф.Ф.К. Линуэну (1911–1979) за открытия, связанные с механизмом и регуляцией холестерина и жирных кислот.

1969 — вручение Нобелевской премии М. Дельбрюку, А. Херши, С. Лурия.

1969 — химический синтез искусственного гена, кодирующего аланиновую тРНК дрожжей (Корана Х.Г.).

1969 — Леонард Герценберг (генетик из Стенфорда) разработал флуоресцентно активируемый клеточный сортер, который позволяет идентифицировать до 5000 близко расположенных друг к другу животных клеток.

1969 — выход на русском языке книги Дж. Уотсона «Двойная спираль».

1969 — создан коммерческий гибрид пшеницы и ржи (тритикале).

1969 — присуждение А.А. Баеву с коллегами Государственной премии СССР за определение полной нуклеотидной последовательности валиновой тРНК пекарских дрожжей (1967).

1974 — 25 лет со дня написания и публикации П. Бергом с коллегами открытого письма о потенциальной опасности использования рекомбинантных ДНК.

1974 — разработка Фредериком Сенгером метода секвенирования ДНК.

1974 — публикация статьи С. Коэна и Г. Бойера об экспрессии чужеродного гена, имплантированного в бактерии с помощью методов рекомбинантной ДНК.

1979 — разработан метод клонирования ДНК, позволяющий выделять и клонировать тысячи различных генов (Bender W.W., Hogness D.S.).

1979 — сообщение о клонировании гена гормона роста человека (Baxter John).

1979 — в лаборатории William J. Rutter из Калифорнийского университета в Сан-Франциско (UCSF) выделен белок оболочки вируса, вызывающего гепатит В.

1979 — синтез генов соматостатина и инсулина с помощью метода рекомбинантной ДНК (компания «Дженентек» и The City of Hope National Medical Center, California, USA).

1984 — разработка метода генетических «отпечатков пальцев» — «DNA fingerprinting technique» (Джеффрис А.).

1984 — открытие механизма передачи генов от почвенных бактерий рода *Agrobacterium* в растения (Van Montagu M., Schell J.).

1984 — вручение Нобелевской премии Ж. Келлеру и С. Мильштейну за получение моноклональных антител.

1984 — Стенфордский университет получил патент на производство ДНК прокариот.

1984 — корпорация Chiron объявила о первом клонировании и секвенировании целого генома вируса иммунодефицита человека.

1989 — создание в США Национального центра по исследованию генома человека во главе с лауреатом Нобелевской премии Джеймсом Уотсоном.

1989 — разработка учеными Калифорнийского университета Davis рекомбинантной вакцины против смертельного вируса чумы рогатого скота.

1989 — 20 лет со дня вручения Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж.М. Бишопу и Х.Э. Вармусу за открытие клеточного происхождения ретровирусных онкогенов.

1994 — в США разрешена продажа в магазинах первого генетически модифицированного пищевого продукта — медленно созревающих томатов сорта «Флавр Савр».

1999 — создание первого растения с измененной пищевой ценностью: риса, содержащего бета-каротин (так называемый «золотой рис»). В 2005 году получена новая разновидность генетически модифицированного риса «Golden Rice 2», в котором бета-каротин содержится в 23 раза больше по сравнению с первым вариантом.

1999 — расшифрован геном дрозофилы.

2004 — расшифрован геном крысы.

ПЕРСОНАЛИИ

200 лет со дня рождения Чарльза Дарвина (12 февраля 1809 — 1882).

175 лет со дня рождения Д.И. Менделеева (8 февраля 1834 – 1907).

160 лет со дня рождения Йохана Густава Кьельдаля (J.G.Ch. Kjeldahl, 1849–1900), датского химика. Автор известного метода определения количества белка и азотсодержащих соединений в тканях и жидкостях организма (метод Кьельдаля, 1883).

160 лет со дня рождения и 90 лет со дня смерти Уильяма Ослера (William Osler, 1849–1919), канадского терапевта. В числе ряда других заболеваний описал синдром наследственных геморрагических телеангиоэктазий (болезнь Ослера – Рандю) (1901).

140 лет со дня рождения Фибуса Аарона Теодора Левина (Phoebus Aaron Theodor Levene, 1869–1940), русско-американского биохимика, ученика И.П. Павлова, автора тетрауклеотидной гипотезы.

115 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Владимира Александровича Энгельгардта (1894–1984), отечественного биохимика.

115 лет со дня рождения Льва Александровича Зильбера (1894–1966), отечественного вирусолога.

115 лет со дня рождения Александра Ивановича Опарина (1894–1980), отечественного биохимика.

110 лет со дня рождения Фрица Альберта Липмана (Fritz Albert Lipmann, 1899–1986), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие коэнзима А (1953, вместе с Х. Кребсом, который получил ее за открытие цикла лимонной кислоты).

110 лет со дня рождения Альбера Клода (1899–1983), бельгийского цитолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, вместе с Дж. Паладе и К. Де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

110 лет со дня рождения Макфарлейна Франка Бернета (M.F. Burnet, 1899–1985), австралийского иммунолога и вирусолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с П.

Медавара) за открытие искусственной иммунной толерантности.

110 лет со дня рождения Александра Николаевича Несмеянова (1899–1980), отечественного химика-органика, президента АН СССР (1951–1961).

105 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Александра Александровича Баева (1904–1994), российского биохимика.

105 лет со дня рождения Глеба Михайловича Франка (1904–1976), российского биофизика.

105 лет со дня рождения Георгия Антоновича Гамова (1904–1968), американского физика, русского по происхождению, эмигрировавшего в 30-е годы. Автор крупных открытий и гипотез в теоретической физике (туннельный эффект) и астрофизике (теория эволюции звезд с термоядерным источником энергии, теория Большого Взрыва вселенной). Ему же принадлежит идея триплетности генетического кода (обнародована в 1954 г.).

100 лет со дня рождения Эдварда Л. Тейтама (Edward Lawrie Tatum, 1909–1975), американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1958 года, вместе с Джорджем Уэлсом Бидлом – за открытие способности генов регулировать определенные химические процессы, и Джошуа Ледербергом, которому была присуждена премия за открытия, касающиеся генетической рекомбинации у бактерий и структуры их генетического аппарата.

100 лет со дня рождения Риты Леви-Монтальчини (род. в 1909 г.), итальянского нейробиолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1986, совместно со Стенли Коэном) за открытие факторов роста.

95 лет со дня рождения Ренато Дульбекко (род. в 1914 г.), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1975, совместно с Х.М. Теминым и Д. Балтимором) за открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом клетки.

80 лет со дня рождения Вернера Арбера (род. в 1929 г.), швейцарского генетика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1978, вместе с Х.О. Смитом и Д. Натансом) за открытие ферментов рестрикции и приложение этих знаний к проблемам молекулярной генетики.

80 лет со дня рождения Джералда Мориса Эделмана (род. в 1929 г.), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, вместе с Р.Р. Портером) за открытия, касающиеся химической структуры антител.

75 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Хоурда Мартина Темна (1934–1994), американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1975, совместно с Р. Дульбекко и Д. Балтимором) за открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом клетки.

75 лет со дня рождения Юрия Анатольевича Овчинникова (1934, 2 августа – 1988), российского молекулярного биолога, вице-президента АН СССР (1974–1988).

75 лет со дня рождения Николая Альфредовича Платэ (1934–2007), отечественного химика, академика РАН, главного ученого секретаря Президиума РАН (1996–2001), вице-президента РАН (2001–2007).

75 лет со дня рождения Бенгта Ингемара Самуэльсона (род. в 1934 г.), шведского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1982, вместе с С.К. Бергстромом и Дж.Р. Вейном) за открытия, касающиеся простагландинов и родственных им биологически активных веществ.

75 лет со дня рождения Ильи Артемьевича Захарова-Гезехуса (род. в 1934 г.), российского генетика, члена-корреспондента РАН.

70 лет со дня рождения Сусуму Тонегавы (Susumu Tonegawa, род. в 1939 г.), американского иммуногенетика, японца по происхождению, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1987) за открытие генетического принципа происхождения разнообразия антител.

70 лет со дня рождения Лиленда Х. Хартвелла (Liland H. Hartwell, род. в 1939 г.), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2001, совместно с Р. Тимоти Хантом и Полом М. Нерсом) за открытие ключевых регуляторов клеточного цикла.

70 лет со дня рождения Харолда Элиота Вармуса (р. в 1939 г.), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1989, совместно с Дж.М. Бишопом) за открытие клеточного происхождения ретровирусных онкогенов.

65 лет со дня рождения Филлипа Аллена Шарпа (Phillip Allen Sharp, род. в 1944 г.), американского генетика, соавтора открытия расщепления (сплайсинга) генов. Разделил Нобелевскую премию по физиологии и медицине 1993 года с Ричардом Дж. Робертсом «за открытие, независимо друг от друга, прерывистой структуры гена».

65 лет со дня рождения Кэри Б. Муллиса (Gary B. Mullis, род. в 1944 г.), американского биохимика, создателя метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), лауреата Нобелевской премии по химии 1993 года (совместно с канадским биохимиком Майклом Смитом).

60 лет со дня рождения Пола М. Нерса (Paul M. Nurse, род. в 1949 г.), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2001, совместно с Р. Тимоти Хантом и Лилендом Х. Хартвеллом) за открытие ключевых регуляторов клеточного цикла.

65 лет со дня смерти А. Карреля (1873–1944), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1912 г.

60 лет со дня смерти Феликса Д'Эрелля (F.H. D'Erelle, 1873–1949), канадского бактериолога, открывшего бактериофаги в 1917 г.

30 лет со дня смерти Эрнста Б. Чейна (1906–1979), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1945 г. (совместно с А. Флемингом и Х.У. Флори) за открытие пенициллина.

25 лет со дня смерти Карла Ф. Кори (1896–1984), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1947 года за открытие каталитического

превращения гликогена (вместе с его супругой Гертой Т. Кори).

20 лет со дня смерти Джорджа У. Бидла (1903–1989), лауреата Нобелевской премии 1958 года (вместе с Э.Л. Тейтемом и Дж. Ледербергом).

15 лет со дня смерти Дороти Мэри Кроуфут-Ходжкин (1910–1994), английского химика, лауреата Нобелевской премии (1964), иностранного члена АН

СССР (1976). Награждена золотой медалью им. М.В. Ломоносова (1982).

10 лет со дня смерти Даниеля Натанса (1928–1999), лауреата Нобелевской премии 1978 года (вместе с В. Арбером и Х.О. Смитом).

5 лет со дня смерти Френсиса Крика (1916–2004), лауреата Нобелевской премии 1962 года (вместе с Дж. Уотсоном и М.Х.Ф. Уилкинсом).

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2009 ГОДА*

9–11 февраля 2009 года в Москве состоялась 21-я Зимняя Международная Молодежная Научная Школа. Это традиционное мероприятие, проводимое Институтом биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. В его рамках была проведена конференция молодых ученых, аспирантов и студентов.

16–20 марта 2009 года в Москве состоялся V Московский международный конгресс «Биотехнология» и Седьмая международная специализированная выставка «Мир биотехнологии 2009». Были организованы 11 секций, пленарное заседание, международный симпозиум Черноморской биотехнологической ассоциации.

ПУБЛИКАЦИИ

Уолкер Ш. *Биотехнология без тайн. Путеводитель / Пер. с англ.* — М.: Эксмо, 2008. — 336 с. — (Без тайн).

Резюме. Переводная книга научно-популярного характера, вводящая читателя в предметную область и основной перечень проблем, которыми занимается биотехнология. Книга состоит из 13 глав, в которых последовательно рассматриваются следующие вопросы: биомолекулы и энергия; структура и деление клеток; способы передачи информации в клетке; генетика; иммунология; иммунотерапия и другое применение биоинженерии; рекомбинантные технологии и расшифровка ДНК; протеомика; стволовые клетки; применение в медицине; применение в сельском хозяйстве; применение в промышленности и очистке окружающей среды; будущее. По главам даны вопросы для самоконтроля. В конце книги приведен набор тестовых вопросов по 101 теме («заключительный экзамен»). Имеется список литературы из 57 источников. Книга входит в серию «Demystified» («Без тайн»), напечатанную на английском языке издательством МакГроу-Хилл (Sharon Walker. *Biotechnology. A self-teaching guide. Demystified.* — McGraw-Hill, 2007) и изданную в русском переводе издательством «Эксмо». Кроме этого, изданы подобные книги по генетике, биологии

и т.д. Книга предназначена для широкого круга читателей, интересующихся фундаментальными и прикладными аспектами биотехнологии.

Белюсова Р.В., Преображенская Э.А., Третьякова И.В. *Ветеринарная вирусология.* — М.: КолосС, 2007. — 448 с.

Аннотация. Рассмотрены вопросы общей и частной вирусологии. Даны характеристики вирусов, наиболее часто вызывающих инфекционные заболевания у животных разных видов. Приведены сведения о клинических и патологоанатомических проявлениях болезней, характеристики возбудителей, указаны методы диагностики. Учебник издан в серии «Учебники и учебные пособия для высших учебных заведений» и предназначен для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария».

Супотницкий М.В. *Словарь генетических терминов.* — М.: Вузовская книга, 2007. — 508 с. — Серия «Словари-справочники».

Аннотация. Словарь включает в себя описание около 3000 терминов, наиболее употребительных в современной генетической литературе, а также термины из биохимии, иммунологии, гистологии и медицины, непосредственно связанные с изучением генетики либо используемые для описания наследственных болезней человека. Большинство терминов снабжено сведениями об их происхождении и переводами на английский язык. Указатель терминов на английском языке позволяет использовать словарь еще и в качестве англо-русского.

Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. 16 Volume Set / Ed. by Robert A. Meyers. 2nd ed. — Wiley-VCH, 2006. — 9932 p. (pdf, 991 MB).

Резюме. Электронная версия уникального 16-томного издания, осуществленного издательством Wiley второй раз в 2004–2005 гг. В нем содержится более 400 статей (16-й том представляет собой указатель).

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

Биохимия. Краткий терминологический словарь / Вавилова Т.П. (ред.). — М.: Веди, 2006. — 128 с.

Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2007. — 704 с. — (Учеб. лит. Для студентов медвузов).

Nucleic acids from A to Z: A concise encyclopedia / Ed. by Sabine Mueller. — N.Y.: Wiley, 2008. — XIV, 336 p.

Резюме. Довольно полная миниэнциклопедия, содержащая более 1500 статей, охватывающих все важнейшие концепции, химические вещества, методы, акронимы. Книга может быть полезна многим: от студентов до научных работников.

Miller A.D., Tanner J. Essentials of Chemical Biology: Structure and Dynamics of Biological Macromolecules. — Wiley, 2008. — 590 p.

Резюме. Руководство по химической биологии. В нем 10 глав: структура биологических макромолекул и липидных комплексов; химический и биологический синтез; молекулярная биология как набор инструментов для химической биологии; электронная и вибрационная спектроскопия; магнитный резонанс; дифракция и микроскопия; распознавание и связывание молекул; кинетика и катализ; масс-спектрометрия и протеомика; молекулярный отбор и эволюция. Материал интересен для химиков-органиков, биохимиков, молекулярных биологов, а также специалистов, занятых в фарминдустрии.

Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. Brock Biology of Microorganisms. 12th ed. — Benjamin Cummings, 2008. — 1168 p.

Резюме. Книга на протяжении десятилетий является одним из лучших вводных курсов микробиологии. Она содержит как классические подходы, так и современные концепции данной науки. В ней изложен материал с полным охватом основных проблем и разделов микробиологии, в том числе генная инженерия, микробная протеомика, биоремедиация, симбиозы, патогенность, промышленная микробиология, биотехнология и т.д.

Best Practices in Biotechnology. Friedman Yali (ed.). — Logos Press, 2008. — 356 p.

Байднер Г., Бэше Ф. Бизнес по науке: чему менеджерам стоит научиться у биотехнологов / Пер. с англ. Ю. Корниловой, под ред. А. Плошницы. — М.: Изд-во «Манн, Иванов и Фербер», 2008. — 272 с. — (Книги Стокгольмской школы экономики).

Аннотация. Биотехнология — знакомое всем сочетание. Но многие ли смогут сходу описать эту отрасль, назвать ведущего игрока рынка, компанию Amgen, и объяснить, как компания с очень долгим циклом разработки, выпустившая первый продукт только через 9 лет после своего основания, смогла стать ведущей в отрасли и войти в список Fortune 500? «Бизнес по науке» простым человеческим языком объясняет суть биотехнологий и секреты менеджмента Amgen. Это уроки лидерства и управления, которые пригодятся в любой отрасли. Компании, поставившей во главу угла научные разработки, исследования, точно есть, что рассказать о правильном построении бизнеса. Доказательством тому — их результаты: Fortune 500, 3 миллиарда выручки в 2007 году и 9 фармацевтических продуктов — это уже не околонушно!

Биоэнергетика: мировой опыт и прогноз развития. Научное издание. — М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2008. — 404 с.

Аннотация. Дана оценка потенциала биоэнергетики в Российской Федерации и эффективности ее применения в аграрном секторе экономики. Представлены пилотные проекты, реализуемые в ряде регионов России, по переработке биомассы, получению сырья для биотоплива и биодобавок к топливу. Проведен анализ состояния отечественного и зарубежного рынка в этой сфере. Приведен комплекс мер государственного регулирования, направленных на увеличение производства биологических видов топлива на основе расширения посевов энергетических культур — рапса, кукурузы, сорго, пшеницы и других высокоэнергетических культур, а также стимулирования экспортного потенциала России по биотопливу и сырью для его производства. Приведены меры по поддержке инновационной и инвестиционной деятельности в этом направлении. Определены тенденции и приоритетные направления развития биоэнергетики в мире.

Thieman W.J., Palladino M.A. Introduction to biotechnology. 2nd ed. — Benjamin Cummings, 2008. — 408 p.

Резюме. Пособие для студентов, вводящее в курс проблем биотехнологии. В книге имеются разделы, посвященные генам и геномам, технологии рекомбинантной ДНК, различным ветвям биотехнологии — сельскохозяйственной, медицинской и т.д.

Шредингер Эрвин. Мой взгляд на мир: Пер. с нем. 2-е изд. — М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009. — 152 с.

Резюме. Второе (стереотипное) издание перевода на русский язык философской книги известного австрийского физика, лауреата Нобелевской премии Эрвина Шредингера. В журнале «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова» приводилась аннотация первого издания этой книги (2006, Т. 2, № 3, С. 82–83). Выход в свет нового издания свидетельствует о востребованности этой книги со стороны читателей. Действительно, язык произведения очень необычный, экспрессивный, в нем проявляется стремление яснее донести читателю суть проблемы в целом и собственного мнения автора. Тема крайне сложна — рассуждения о цельности мировоззрения, принадлежащие одному из величайших физиков XX столетия. Однако интерес к книге растет. Кстати, текст книги имеется и в электронном виде: www.PHILOSOPHY.ru/library/vorgos/70.html (она носит название «Мое мировоззрение»).

Лейман Д. Биология без тайн / Пер. с англ. и ред. А.Е. Дорочаева. — М.: Эксмо, 2008. — 416 с. — (Без тайн).

Резюме. Обзор по современной биологии, представленный в научно-популярной форме. Издание носит также учебно-познавательный характер и содержит вопросы для самоконтроля.

Уиллет Э. Генетика без тайн. — М.: Эксмо, 2008. — 224 с. — (Без тайн).

Резюме. В книге 14 глав, в которых представлен общий взгляд на генетику как вводный курс для широкого читателя. Как принято в западных изданиях подобного рода, книга снабжена тестирующими вопросами.

Ридли М. Геном: автобиография вида в 23 главах / Пер. с англ. и ред. О.Н. Ревы. — М.: Эксмо, 2008. — 432 с.

Аннотация. Стремительное развитие генетики в последние два десятилетия называют не иначе, как революцией. Начиная с 1990-х годов, когда в практику вошли принципиально новые методы исследований ДНК, каждый год приносит больше открытий, чем было сделано за все предыдущие годы, начиная со старины Менделя. Генетика развивается столь стремительно, что уследить за тем, как изменяются наши представления о фундаментальных основах жизни и наследственности, не успевает не только широкая публика, но и специалисты. Это порождает массу слухов и домыслов о страшных мутантах, которых коварные ученые штампуют в своих лабораториях, тогда как поразительные открытия новых методов диагностики и лечения генетических заболеваний, включая рак, остаются незамеченными или непонятыми. Книга Мэтта Ридли очень актуальна. Просто и доступно автор представил историю генетики от первых догадок до ошеломляющего прорыва, начавшегося с открытия структуры ДНК Уотсоном и Криком. На английском языке книга вышла в свет в конце 1999 года, в канун нового тысячелетия. Но эта книга по-прежнему занимает «топовые» [высшие] позиции в рейтингах продаж по всему миру. В ней есть то, что не устаревает: дух научных открытий и история генетики, представленная со всем драматизмом споров, дискуссий, озарений одних ученых и черной завистью других.

Уильямс Л., Адамс У. Нанотехнологии без тайн. Путеводитель / Пер. с англ. Ю.Г. Гордиенко. — М.: Эксмо, 2009. — 368 с. — (Без тайн).

Аннотация. Эта книга предназначена тем, кто хочет познакомиться с основами нанотехнологий, но не собирается заниматься ими профессионально, кому интересно узнать о том, как нанотехнологии влияют на биологию и химию, окружающую среду и промышленность, политику и экономику. Подробно и занимательно описываются многочисленные вопросы от самых простых до самых сложных и интересных. Задания для самопроверки помогут читателю проверить полученные знания.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2009 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

15–16 апреля 2009 года в Москве состоится Международный конгресс «Топливный биоэтанол – 2009». Организатор: Национальная биотопливная ассоциация. Справки: тел.: (495) 585-51-67; факс: (495) 585-54-49; E-mail: congress@biotoplivo; www.biotoplivo.ru.

21–24 апреля 2009 года в Москве будет проходить 10-й Юбилейный Международный форум «Высокие технологии XXI века» – «ВТ XXI». Форум проводится под патронатом Торгово-промышленной палаты РФ. Среди организаторов: Минпромторг России, Департамент науки и промышленной политики города Москвы. Планируется секция по биотехнологии. Справки: тел.: +7 (495) 332-36-01, 332-35-35; http://www.vt21.ru/

8–9 мая 2009 года в Афинах (Греция) состоится 5-й Международный биотехнологический форум (IGBF5). Справки: http://igbf.gr.

18–21 мая 2009 года в Атланте (Джорджия, США) состоится очередной конгресс биотехнологов «BIO 2009 International Convention». Справки: http://www.convention.bio.org/

23–26 мая 2009 года в Вене (Австрия) проводится «Европейская конференция по генетике человека 2009». Организатор: Европейское общество генетики человека. Справки: www.nature.com/ejhg.

6 июня 2009 года в Сан Диего (Калифорния, США) состоится Ежегодный симпозиум по биофармацевтике. Справки: http://www.sdbiopharma.org/

16–18 июня 2009 года в Новосибирске пройдет 5-й Германо-российский биотехнологический форум. Справки: http://www.bionet.nsc.ru/chair/grfb/index.html.

23–27 июня 2009 года в Казани состоится IV Российский симпозиум «Белки, пептиды». Организаторы: Российская академия наук, Научный совет по

биоорганической химии, Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, Институт биоорганической химии им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова (Ленина). Справки: www.belper.knc.ru.

1–3 июля 2009 года в Токио (Япония) состоится международный форум «INTL BIO FORUM & BIO EXPO JAPAN». Справки: тел.: 050-1498-4475 (81-50-1498-4475); факс: 03-3288-9388. http://www.bio-expo.jp/english/index.phtml.

5–9 июля 2009 года в Берне (Швейцария) пройдет конференция «Biotrans 2009 – Switzerland». Справки: http://www.biotrans2009.org.

19–22 июля 2009 года в Монреале (Квебек, Канада) состоится 6-й Ежегодный всемирный конгресс по промышленной биотехнологии и биопроцессингу. Справки: www.bioorg/worldcongress. E-mail: wepartnering@bioorg.

2–8 августа 2009 года в Шанхае (КНР) состоится 21-й Международный конгресс IUBMB и 12-й Конгресс FAOVMВ по биохимии и молекулярной биологии «Биомолекула для качества жизни». Справки: http://www.iubmb2009.cn/

13–16 сентября 2009 года в Барселоне (Испания) пройдет 14-й Европейский конгресс по биотехнологии (ECB-14). Справки: http://www.ecb14.eu/

16–18 сентября 2009 года в Сан-Франциско (США) состоится 2-я Ежегодная международная конференция-партнеринг «BioPharm America 2009». Справки: www.ebdgroup.com/bpa.

22–23 сентября 2009 года в Гайдарабаде (Индия) будет организована конференция-партнеринг «Bio India». Справки: www.ableindia.org.

23–25 сентября 2009 года в Лилле (Франция) состоится конференция «EuroBio 2009». Справки: http://www.eurobio.event.com/

28 сентября – 1 октября 2009 года в Москве и Пущино состоится Международная научная конференция по биоорганической химии, посвященная 75-летию со

дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова (IX чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова).
Справки: E-mail: yak_ti@ibch.ru.

6–8 октября 2009 года в Ганновере (Германия) организуется выставка-ярмарка «Biotechnica-2009». Это — широкое мероприятие, в рамках которого проводятся конференции, партнеринг, награждения. Справки: www.biotechnica-partnering.com.

2–4 ноября 2009 года в Вене (Австрия) состоится конференция «Bio-Europe 2009». Контакты: Европа — E-mail: arudat@ebdgroup.com; США —

E-mail: tvoigt@ebdgroup.com. Сайт: www.ebdgroup.com/bioeurope.

12 ноября 2009 года в Москве состоится II Российско-Германский Форум. Мероприятие проходит в рамках реализации совместного проекта «Германо-Российский Биотехнологический Кооперационный Союз» под эгидой 7-й Рамочной программы Европейского Сообщества. Организует мероприятие Российский национальный контактный центр «Биотехнология, сельское хозяйство и пища». Контакты: тел./факс: +7 (495) 954-44-74. E-mail: tverdislova@inbi.ras.ru; sharova@inbi.ras.ru.

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, научная 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 рубрикации, со списком литературы, но без резюме; 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 установки (Index Medicus и др.).
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.



Подписано к печати 22.04.09
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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. Ежегодно 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 55 регионах России и объединяет свыше 2000 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.

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 1190171 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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