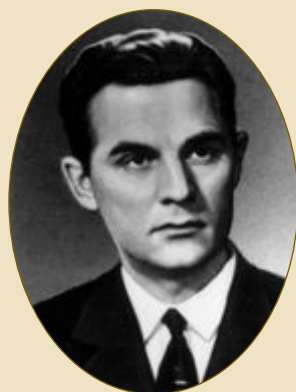


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 8, № 2
2012

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2012, Т. 8, № 2

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василев

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
В.В. Зверев (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолин (Пушино), А.Н. Панин (Москва),
В.О. Попов (Москва), К.Г. Скрябин (Москва), 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@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2012.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Особенности разделения водородсодержащих многокомпонентных газовых смесей биотехнологии с применением мембранно-адсорбционных методов.

О.Л. Амосова, В.В. Тепляков..... 5

Семакс положительно влияет на жизнеспособность клеток трансгенной линии феохромоцитомы крысы РС12, несущей мутантный ген пресенилина-1 человека.

Е.В. Новосадова, И.А. Гривенников, И.В. Бобрышева, А.П. Григоренко, Л.А. Андреева, Е.И. Рогаев, В.Э. Тарантул 15

Определение степени гидролиза лактозы с применением криоскопического метода.

С.И. Нифталиев, Е.П. Дурицын, Р.В. Кораблин, Е.А. Ковырялова..... 22

Состав и биологическая активность метаболитных комплексов из культуральной жидкости бифидобактерий.

Т.В. Крылова, Л.П. Чистохина, В.А. Несчисляев, А.М. Николаева 27

Исследование информативности характеристик ростовых свойств глубинных культур *V. anthracis* для контроля и прогноза процесса спорообразования.

И.В. Дармов, С.А. Швецов, И.Н. Седельников, А.Н. Шевцов, Д.В. Боровской, К.Е. Гаврилов, А.Н. Мошков, В.В. Фокина, Р.Ш. Зиганшин, Е.Ю. Вахнов..... 31

Нуклеотидный полиморфизм в популяциях *Populus tremula* L. Пермского края.

Т.Н. Светлакова, С.В. Боронникова, И.В. Бобошина 43

Технология изготовления икры летучих рыб из сушеного сырья.

Е.А. Ахмерова, Л.Р. Копыленко..... 48

Биокаталитическая трансформация 3-цианопиридина иммобилизованными и суспендированными клетками нитрил-утилизирующих бактерий.

Ю.Г. Максимова, Д.М. Васильев, Г.В. Овечкина, В.А. Демаков 54

Обзоры

Вермикюльтура: инновационные экотехнологии рециклинга бытовых, сельскохозяйственных и промышленных органосодержащих отходов.

И.Н. Титов..... 59

Хроника

События первой половины 2012 года..... 74

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Peculiarities of hydrogen-containing multicomponent gas mixtures separation of biotechnology with using membrane/PSA methods.

O.L. Amosova, V.V. Teplyakov 5

Semax positively influences the viability of transgenic pheochromocytoma line PC12, carrying the human presenilin-1 mutant gene (hPS1).

E.V. Novosadova, I.A. Grivennikov, I.V. Bobrysheva, A.P. Grigorenko, L.A. Andreeva, E.I. Rogaev, V.Z. Tarantul 15

Evaluation of the degree of hydrolysis of lactose using cryoscopic method.

S.I. Niftaliev, E.P. Duritsyn, R.V. Korablin, E.A. Kovyryalova 22

Composition and biological activity of metabolite complexes from the culture fluid of bifidobacteria.

T.V. Krylova, L.P. Chistokhina, V.A. Neschislyayev, A.M. Nikolaeva 27

Study of informativity of characteristics of growth properties of submerged culture *B. anthracis* to control and forecasting process of sporulation.

I.V. Darmov, S.A. Shvetsov, I.N. Sedelnikov, A.N. Shevtsov, D.V. Borovskoy, K.E. Gavrilov, A.N. Moshkov, V.V. Fokina, R.Sh. Ziganshin, E.Ju. Vahnov 31

Nucleotide polymorphism in populations of *Populus tremula* L. Perm region.

T.N. Svetlakova, S.V. Boronnikova, I.V. Boboshina 43

Manufacturing technology of flying fish roe from the dried material.

E.A. Akhmerova, L.R. Kopylenko 48

Biocatalytic transformation of 3-cyanopyridine by immobilized and suspended cells nitrile-utilizing bacteria.

Ju.G. Maksimova, D.M. Vasilyev, G.V. Ovechkina, V.A. Demakov 54

Reviews

Vermiculture: innovative environmental technologies of recycling of domestic, agricultural and industrial organic waste.

I.N. Titov 59

The chronicle

Events of the first half-year 2012 74

Rules for authors 78

К читателям

Второй номер 2012 года содержит ряд статей по теоретическим и практическим аспектам биотехнологии. В работе О.Л. Амосовой и В.В. Теплякова из Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН рассматривается одна из ключевых проблем получения биотоплива — выделение водорода из многокомпонентных газовых смесей биотехнологии с помощью мембранно-адсорбционных методов. В исследовании Е.В. Новосадовой, И.А. Гривенникова с коллегами из академических учреждений Москвы проанализировано влияние семакса на жизнеспособность клеток трансгенной линии феохромцитомы крысы РС12, несущей мутантный ген пресенилина-1 человека. Работа выполняется в контексте современных целенаправленных программ изучения этиологии и патогенеза болезни Альцгеймера. Группа авторов из Воронежа (Нифталиев С.И. и др.) представила материалы исследования степени гидролиза лактозы с применением криоскопического метода.

Проявили активность сотрудники ряда пермских научно-исследовательских институтов и государственного национально-исследовательского университета. Так, Ю.Г. Максимова с соавторами изучили вопрос о биокаталитической трансформации 3-цианопиридина иммобилизованными и суспендированными клетками нитрил-утилизирующих бактерий (родококков, псевдомонад). Т.Н. Светлакова и др. исследовали нуклеотидный полиморфизм 14 генов в семи популяциях тополя Пермского края, что имеет значение для развития лесной биотехнологии в этом важном регионе. Т.В. Крылова и др. провели систематическое исследование состава, физико-химических и биологических свойств ультрафильтратов из культуральной жидкости бифидобактерий.

Обстоятельная работа выполнена коллективом авторов из Кировского ЦНИИИ МО РФ, направленная на выяснение ростовых свойств глубинных структур возбудителя сибирской язвы с целью прогнозирования процесса спорообразования.

Представители ФГУП «ВНИРО» (Москва) Е.А. Ахмерова и Л.Р. Копыленко впервые описали технологию изготовления икры летучих рыб из сушеного сырья, что имеет практическое значение в связи с распространением японской кухни.

Очень подробный обзор современного состояния проблемы вермикультур сделал И.Н. Титов из Владимирского государственного университета. Он проанализировал преимущества и недостатки всех технологических подходов к производству вермикультур и подчеркнул актуальность развития данного направления в РФ как экологически чистого биотехнологического метода.

В разделе «Хроника» публикуется решение круглого стола в Государственной Думе ФС РФ «О совершенствовании законодательного обеспечения развития биомедицинских клеточных технологий в Российской Федерации» от 26 апреля 2012 г., в котором поддерживается это прогрессивное научно-практическое направление.

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

ОСОБЕННОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ ВОДОРОДСОДЕРЖАЩИХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ГАЗОВЫХ СМЕСЕЙ БИОТЕХНОЛОГИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕМБРАННО-АДСОРБЦИОННЫХ МЕТОДОВ

О.Л. АМОСОВА^{1,2**}, В.В. ТЕПЛЯКОВ¹

¹ ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева» РАН,

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Решение проблем выделения (концентрирования) H_2 из некондиционных водородсодержащих газовых смесей (например, биосингаз, биоводород) предполагает разработку безопасных (безреагентных) технологий с низким энергопотреблением. В работе рассмотрены особенности применения мембранно-адсорбционных методов для выделения H_2 из таких смесей, включающих в себя оценку потенциала коммерчески доступных мембран и технологических решений короткоциклового адсорбции (КЦА). В работе представлены результаты сравнения (в том числе расчетного) разделения газовых смесей, содержащих CO , CO_2 , N_2 и H_2S , полученных в процессе пиролиза биомассы тремя типами мембранных модулей (половолоконные модули GENERON®, Air Products, дисковые мембранные модули на основе ПВТМС и рулонный модуль на основе арилатсилоксанового блок-сополимера). Проведены экспериментальные исследования по разделению модельных смесей на лабораторном мембранно-адсорбционном стенде. На основании расчетных и экспериментальных данных показано, что для выделения H_2 из смесей с его содержанием до 50% возможно применение мембранного блока в качестве предконцентратора H_2 с последующим его выделением при помощи КЦА.

Ключевые слова: биоводород, биосингаз, очистка газов.

Введение

Доминирование углеводородных источников в структуре современного топливно-энергетического комплекса все чаще рассматривается экспертами как потенциальная угроза энергетической и экономической безопасности страны. В связи с этим возрастает актуальность разработки и внедрения технологий промышленного получения и использования альтернативных энергоресурсов, в первую очередь, возобновляемых и экологически безопасных. К числу таких источников относится биотопливо — продукт переработки биологического сырья с применением термохимических или микробиологических методов, в частности, этанол [2], бутанол [9], H_2 [6]. Помимо использования в качестве энергоносителя, H_2 также является важным сырьем для многих отраслей промышленности: химической, нефтеперерабатывающей, атомной [3].

В настоящее время около 80–85% H_2 получают путем паровой конверсии и парциального окисления углево-

дородного сырья, в основном метана [3, 6, 22], при этом во многих нефтехимических процессах значительная доля (до 40%) H_2 теряется в сбросных газовых потоках. Прогноз изменения потребления и структуры рынка H_2 в XXI веке [18] предусматривает увеличение потребления H_2 в 16–20 раз к 2100 году по сравнению с уровнем 2000 года, причем 80% этого увеличения связано с использованием H_2 в качестве энергоносителя, в том числе автомобильного топлива. В связи с этим в перспективе источниками H_2 могут служить водородсодержащие смеси, полученные либо с помощью бактерий — продуцентов H_2 (биоводород) [1, 4, 8, 24], либо в результате пиролиза [5, 16, 19, 23, 25] или газификации [12] биомассы (биосингаз).

Производство биоводорода может осуществляться зелеными водорослями, например, *Chlamydomonas reinhardtii* и цианобактериями за счет биофотолитического [1, 8, 10, 11], бактериями, способными к темновой ферментации (темновому брожению) за счет использования высокомолекулярных источников углерода, таких как углеводы [11, 24], и бактериями, способными к фотоферментации, за счет расщепления органических субстратов при освещении в анаэробных условиях [4, 24]. Использование в качестве сырья возобновляемых источников, в том числе отходов промышленности и агропромышленного комплекса, обеспечивает один из путей их рециркуляции и биоремедиации загрязненных почв [1, 4, 8, 11, 24], то

© 2012 г. Амосова О.Л., Тепляков В.В.

* Автор для переписки:

Амосова Ольга Леонидовна,

к.х.н., н.с. лаборатории физико-химии мембранных процессов

ИНХС РАН,

119991 Москва, Ленинский пр., 29

Тел.: +7 (495) 955-42-29

E-mail: o.amosova@gmail.com

есть является энерго-, ресурсосберегающей и природоохранной технологией, что позволяет ожидать в перспективе значительного роста производства биоводорода.

В настоящее время наиболее значимыми с точки зрения практического применения представляются технологии получения H_2 , основанные на темновой ферментации. Микробиологическими продуцентами биоводорода этим способом являются бактерии, например, *Rhodobacter sphaeroides*, *Enterobacter cloacae*, как в чистых, так и в смешанных культурах [4, 8, 24].

Следует указать на то, что существует проблема ингибирования процесса образования H_2 при накоплении последнего в ферментационной среде. Данная проблема обычно решается барботацией среды культивирования инертным газом [4, 8]. Однако этот способ является дорогостоящим и затрудняет дальнейшее разделение газовых смесей на отдельные компоненты. В результате необработанная газовая смесь, покидающая биореактор, содержит от 20 до 80% H_2 , более 20% CO_2 , продувочный газ N_2 или Ar до 80%, а также в некоторых случаях (0–10%) H_2S и (0–2) CH_4 (табл. 1). Решением может стать использование современных технологий газоочистки. Надо отметить, что в большинстве работ, посвященных получению биоводорода, стадия очистки и извлечения его из полученных газовых смесей не рассматривается.

Переработку биомассы можно осуществить еще несколькими способами: 1) пиролизом без доступа воздуха при температуре 500–800 °С (для отходов древесины); 2) газификацией биомассы в присутствии кислорода при довольно высоких температурах (до 1000 °С) или паровым риформингом; 3) пиролизом при более мягких условиях, включая гидролиз в качестве ключевой стадии.

Таким образом, биосингаз является газом, получаемым в результате термохимической переработки биомассы.

В соответствии с расчетами и экспериментами, в среднем, выход процесса составляет до 0,5 тонны газообразных продуктов на 1 тонну исходного сырья (биомассы) в результате термического разложения и до 0,92 тонны на 1 тонну исходного сырья — в результате парового риформинга исходной биомассы [16, 23]. В целом, выход и состав биосингаза сильно зависят от типа используемого сырья и способа получения (см. табл. 1).

В качестве сырья для пиролитического получения биосингаза возможно использование твердых бытовых отходов (бумага, картон, текстиль, различные пластики, торф и прессованную из торфа тару), отходов резинотехнических изделий, нетоварной древесины, отходов растениеводства (лузга и корзиночки подсолнечника, кожура оливок и кофейных зерен, жмых, солома, листва, кукурузные початки, скорлупа орехов, стебли сорняков, плодовые косточки), отходов животноводства (помет животных, иловые осадки), осадков сточных вод [5, 12–16, 19, 23, 25]. Нужно подчеркнуть, что среди различных типов биомассы леггинцеллюлозная биомасса (древесная щепа, древесные обрезки [19, 23, 25]) привлекает повышенное внимание, поскольку не требует дополнительно тщательного подбора исходного сырья. В состав древесины входят целлюлоза (35–50%), гемицеллюлоза (20–30%) и лигнин (20–30%) [23], неорганические соли и летучие низкомолекулярные соединения. Таким образом, пиролиз биомассы фактически сводится к пиролизу смеси целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина в присутствии незначительных количеств различных примесей.

Таблица 1

Источники и характеристики водородсодержащих газов биотехнологии

Источник	Состав газа, об. %							Ссылка
	H_2	CH_4	C+	CO	CO_2	N_2	H_2S	
Биоводород	1–80	0–2	–	–	6–12	1–80	0–12	[4, 8, 10]
Биосингаз	25–42	1	–	25–42	10–35	2–5	1	[5]
Пиролиз ТБО	31–32	25–31	–	20–27	7–13	–	–	[5]
Пиролиз древесины сосны	49,7–52,8	3,8–5,3	1,1–1,6	33,7–34,5	8,6–8,7	–	–	[19]
Пиролиз остатков сточных вод	36,7	14,7	7,1	21,8	13,6	6,3	–	[15]
Пиролиз кожуры кофейных зерен	9,3–40,1	0–11,3	0–2,5	20,6–32,7	17,7–56,6	–	–	[14]
Газификация древесины вяза приземистого	44,3	5,9–7,9	–	17,1	26,8–31,1	–	–	[13]

Примечание: ТБО — твердые бытовые отходы

Как видно из таблицы 1, в результате пиролиза биомассы образуется газовая смесь, преимущественно содержащая H_2 , CO_2 , CO , CH_4 и H_2O , а также, в зависимости от температуры процесса, низшие углеводороды C_2 – C_6 , метиловый спирт, ацетон, смолы и уголь [19, 23, 25]. Можно отметить, что при пиролизе твердых бытовых отходов (ТБО) и древесины образуется газ схожего состава. Затруднения с организацией пиролиза шин и других резинотехнических изделий связаны с тем, что в большинстве отходов содержится фосфор, хлор и сера, для чего требуется дополнительная стадия очистки от образующихся стойких ядовитых соединений (диоксинов и фуранов).

Указанные выше газовые смеси биотехнологии (см. табл. 1) являются водородсодержащими многокомпонентными газовыми смесями и, как правило, содержат значительное количество CO_2 и других примесей, что требует применения стадии выделения H_2 для его дальнейшего использования. В настоящее время широко применяются следующие методы выделения/очистки газов: криогенный, адсорбционный, абсорбционный и мембранный [3, 13, 22]. Проблема извлечения H_2 из многокомпонентных газовых смесей подразумевает разработку безопасных технологий с низким энергопотреблением. Наименее энергоемкими являются мембранный и адсорбционный методы [13]. Ранее [4] нами была показана возможность использования гибридных мембранно-адсорбционных методов для выделения H_2 из газов, получаемых бактериями – продуцентами H_2 . Известные мембранные методы разделения, как правило, эффективны при выделении H_2 из смесей с его содержанием более 20% об.; при этом получение высокочистого H_2 в одну стадию невозможно из-за ограниченной селективности мембран [4, 22] (исключением являются неорганические мембраны на основе палладия, применение которых ограничено). Использование короткоциклового безнагревной адсорбции оправдано в случае содержания H_2 в смеси более 60% об. [13, 22]. В работе рассматривается мембранно-адсорбционный метод, заключающийся в применении мембранного разделения на первой стадии для предконцентрирования H_2 до 50–70% об. и последующей очистки H_2 в блоке КЦА.

Работа представляет результаты оценки потенциала мембранно-адсорбционных разделительных систем, сочетающих газоразделительные свойства мембранных модулей на основе коммерчески доступных полимерных мембран и КЦА, для извлечения/очистки H_2 . Таким образом, данная работа продолжает цикл исследований гибридных мембранных процессов для выделения H_2 из многокомпонентных газовых смесей биотехнологии.

Материалы и методы

Модельные газовые смеси готовили объемным методом. Эксперименты по разделению многокомпонентных смесей были выполнены на разработанном лабораторном мембранно-адсорбционном стенде. Стенд состоит из трех блоков: подготовки газов, мембранного и КЦА. Стенд позволяет проводить эксперименты при давлениях до 10 атм, входном потоке до $6 \text{ м}^3/\text{ч}$ (н.у.) в интервале температур от 20 до 60°C . В мембранный блок входят ресивер, поволоконный модуль GENERON®, дисковый мембранный модуль ПВТМС, панель контроля и управления.

В условиях стационарного состояния потоков составы газовых смесей определяли с помощью газоанализаторов: по O_2 (ППК-4, ОАО «Практик-НЦ»); по CO_2 (Riken Infrared Gas analyzer – RI-550A, «Riken»); по H_2 также состав газовой фазы определяли с помощью метода газовой хроматографии на хроматографе Shimadzu 8A (Япония) с катарометром, оснащенный угольной колонкой $1000 \times 2,5$ мм: газ-носитель – гелий, температура термостата колонок – 100°C . Данные, полученные при проведении хроматографического анализа, обрабатывали на компьютере с помощью программного обеспечения Экохром (Россия).

Концентрацию газа измеряли при атмосферном давлении. Структурные характеристики адсорбентов определяли методом низкотемпературной адсорбции N_2 с применением уравнения БЭТ. Изотермы адсорбции O_2 , N_2 , H_2 , CO_2 получали весовым и объемным методами. Для исследования процессов разделения газовых смесей адсорбционным методом был сконструирован блок КЦА на основе модернизированной схемы Скарстрема [13, 22], включающий в себя два адсорбера, два пневмоклапана для подачи газовой смеси в адсорберы, два – для сброса газа, обедненного целевым компонентом, четыре обратных клапана (два – для подачи продукционного газа в накопительный ресивер и два – для продувки адсорберов), дроссельное устройство на выходе из ресивера и блок управления клапанами с помощью интеллектуального реле Zelio Logic SR2 (программная среда Zelio Soft v.1.4.2). Относительная погрешность измерения не превышала 7%.

Коммерческие мембраны и мембранные модули: GENERON® (тетрабромполикарбонат), AIR PRODUCTS (полисульфон), ПВТМС (поливинилтриметилсилан), СИЛАР® (арилат-силоксановый блок-сополимер). Среди выбранных мембран представлены высокопроизводительные и высокоселективные

мембраны как зарубежных, так и отечественных производителей.

Адсорбенты для использования в блоке КЦА: углеродные молекулярные сита на основе карбонизата бурого угля (УМСБАУ) и сферический газовый активированный уголь (СГАУ), адсорбенты производства Германии «CarboTech MP».

Результаты и обсуждение

Оценка потенциала коммерческих газоразделительных полимерных мембран. К мембранам, применяющимся для разделения газов, предъявляется ряд требований: высокая проницаемость, высокая селективность, доступность. Известно, что в настоящее время на практике применяют газоразделительные мембраны на основе ограниченного числа полимеров (полиимиды, полисульфон, тетрабромполикарбонат, ацетат целлюлозы, полисилоксаны, полифениленоксид) [2, 5, 22, 24], которые хорошо разделяют воздух, смеси H_2/N_2 , H_2/CH_4 , но не достаточно хорошо разделяют такие компоненты, как H_2/CO_2 , He/CO_2 .

Поскольку опубликованные данные по транспортным характеристикам выбранных коммерчески доступных мембран очень ограничены, на первой стадии провели оценку их проницаемости по отношению к компонентам водородсодержащих газовых смесей (CH_4 , H_2S , CO , SO_2), данные по которым не были доступны в литературе (табл. 2). Расчеты выполнены отдельно для каждой мембраны с использованием разработанной ранее «Функциональной Базы Данных» с функцией расчета недостающих величин на основе анализа корре-

кций «проницаемость – молекулярные свойства газа» с решением системы линейных уравнений [24]:

$$\ln(Q_1) = \alpha - \beta(d_1^2) + \gamma(\varepsilon_1 / k),$$

$$\ln(Q_2) = \alpha - \beta(d_2^2) + \gamma(\varepsilon_2 / k),$$

.....

$$\ln(Q_n) = \alpha - \beta(d_n^2) + \gamma(\varepsilon_n / k),$$

где Q – поток газа через мембрану, л/(м²·ч·атм); ε/k – силовая постоянная потенциала Леннарда – Джонса; d – эффективный диаметр молекул пенетранта; α , β , γ – константы.

Необходимо отметить, что применительно к мембранному разделению смеси H_2/CO_2 коэффициенты диффузии $D_{H_2} > D_{CO_2}$, а коэффициенты растворимости $S_{CO_2} > S_{H_2}$. Взаимно компенсирующее сочетание этих параметров приводит к тому, что полимерные мембраны имеют низкую селективность разделения H_2/CO_2 . Следовательно, одностадийное выделение H_2 из многокомпонентных смесей, содержащих CO_2 , с высокой чистотой и степенью извлечения с использованием исследуемых полимерных мембран не представляется возможным. Альтернативный способ выделения H_2 предполагает применение КЦА, однако для эффективной работы КЦА содержание H_2 в смеси должно быть не менее 50% об. [5, 22]; при этом наилучшие показатели достигаются, когда содержание H_2 составляет >70% об. (далее %). Таким образом, целесообразно использовать мембранные методы для предконцентрирования H_2 до 60–70%, с последующей доочисткой водородного концентрата в процессах КЦА.

Таблица 2

Проницаемость (Q) исследуемых полимерных мембран

Мембраны и мембранные модули	Q, л/(м ² ·ч·атм)								
	H ₂	He	CO ₂	O ₂	SO ₂	H ₂ S	N ₂	CO	CH ₄
ПВ, GENERON®	160*	180	45	13,6	10,3*	4*	1,8	1,6*	1,3
ПВ, AIR PRODUCTS	151	151	104	22,7	47,5*	14,3*	3,8	6,6	6,3
Диск, ПВТМС	2000	1800	1600	450	1000*	350*	120	150*	220
Рулон, СИЛАР®	440	250	2000	400	2570	1195	190	270	545

Примечание: * – рассчитанные значения, ПВ – половолоконный модуль

Из таблицы 2 видно, что в мембранном модуле GENERON® проницаемости по He и H₂ имеют близкие значения; поэтому в целях обеспечения безопасности при проведении экспериментов в модельные газовые смеси H₂ был добавлен в качестве метки, основное же его количество было заменено на He. Аналогично CO и CH₄ был заменен на N₂ в случае водородсодержащих газовых смесей и на O₂ — в случае гелийсодержащих газовых смесей. Необходимо отметить, что O₂ лучше моделирует CO и CH₄ при разделении их методов КЦА.

Расчет и экспериментальное исследование мембранного разделения многокомпонентных смесей.

Для расчета разделительных характеристик мембранных модулей различного типа была разработана «Программа для ЭВМ» [7], позволяющая проводить расчеты при прямоточной, противоточной организации потоков, а также в режиме перекрестного тока в мембранном модуле. На основании заданных исходных значений параметров системы (концентрации компонентов на входе системы, давление, потоки, площадь мембраны, проницаемость мембраны по исследуемым компонентам) были получены на выходе значения целевых параметров — концентрации компонентов в пермеате и ретентате.

Для проверки «Программы для ЭВМ» были проведены эксперименты с использованием дискового (мембрана ПВТМС) и полволоконного (GENERON®) газоразделительных мембранных модулей. В качестве модельной смеси применяли двухкомпонентную O₂/N₂, а также трехкомпонентную газовую смесь He/CO₂/O₂ (рис. 1).

Полученные экспериментальные зависимости показали хорошую сходимость с расчетными (в пределах погрешности эксперимента). Установлено, что при увеличении давления на входе в систему и/или при уменьшении

степени отбора θ (отношении потока пермеата к исходному) концентрация более проникающего компонента в пермеате увеличивается.

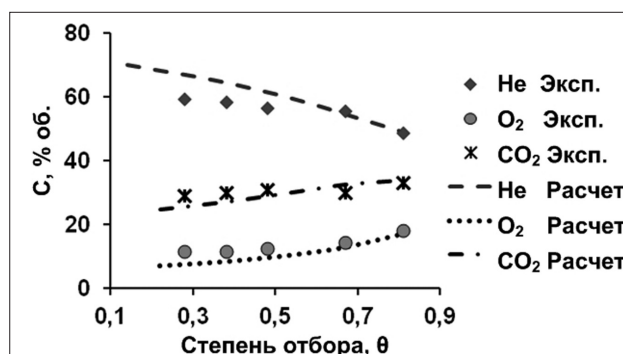


Рис. 1. Зависимость концентрации He, CO₂, O₂ в пермеате от степени отбора (θ) при разделении газовой смеси модулем GENERON®. Перепад давления 4/1 атм

Анализ расчетных и экспериментальных данных продемонстрировал, что наилучшие разделительные характеристики достигаются при следующих режимах работы мембранных модулей: противоток для полволоконного модуля и перекрестный ток для дискового модуля. Хорошая сходимость расчетных и экспериментальных данных подтвердила возможность применения разработанной «Программы для ЭВМ» для расчета разделения многокомпонентных газовых смесей.

Для оценки характеристик мембранной стадии разделения были проведены расчеты по извлечению H₂ (He в модельной смеси) из газов биотехнологии различного состава (см. табл. 1). В качестве примера на рисунке 2 и в таблице 3 представлены результаты расчетов разделения биосингаза следующего состава: 40% H₂, 29% CO, 28% CO₂, 1% CH₄, 1% N₂, 1% H₂S.

Таблица 3

Состав пермеата и ретентата при разделении биосингаза, степень отбора (θ) соответствует предконцентрированию H₂ до 70%

Компонент	GENERON®, S = 10 м ² ; $\theta = 0,5$		ПВТМС, S = 10 м ² ; $\theta = 0,3$	
	C _{пермеат} , %	C _{ретентат} , %	C _{пермеат} , %	C _{ретентат} , %
H ₂	70,0	10,2	59,7	32,6
CO ₂	28,4	27,6	35,3	25,1
CO	1,8	62,2	5,4	38,5
CH ₄	0,04	1,9	0,2	1,3
N ₂	0,06	1,9	0,1	1,3
H ₂ S	0,1	1,8	0,3	1,2

Примечание: S — площадь мембраны

Значения исходных операционных параметров: расход разделяемой смеси — 1–60000 м³/ч (н.у.), перепад давлений на мембране — 10/1 атм, площадь мембраны — 10 м².

Оценки показали, что применение высокоселективных мембран на основе тетрабромполикарбоната дает возможность извлекать Н₂ из биосингаза с получением концентраций более 70% и степенью извлечения более 95% при одностадийном разделении (рис. 2), что достаточно для его последующего выделения методом КЦА. При разделении смеси, содержащей 40% Н₂, мембраны ПВТМС обеспечивают концентрирование Н₂ до 60% при степенях извлечения Н₂ до 48%.

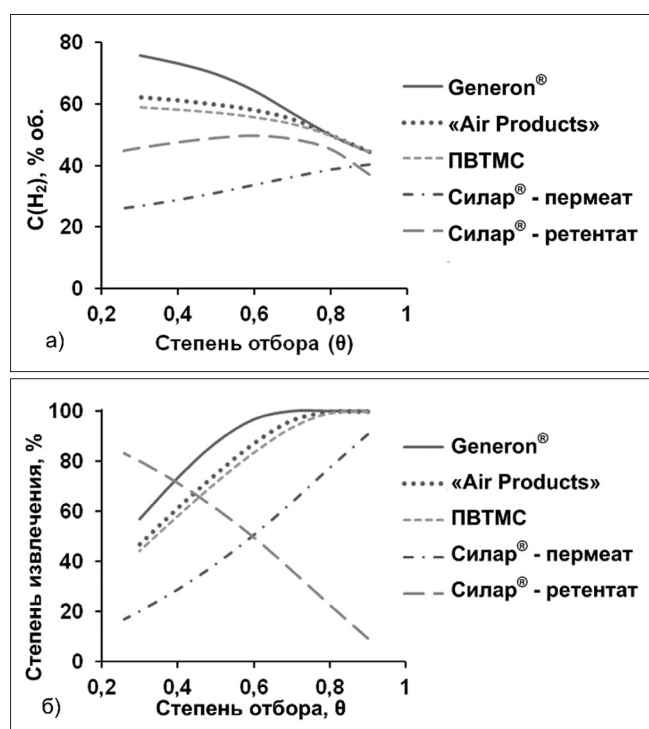


Рис. 2. Зависимость концентрации Н₂ в пермеате (а) и степени извлечения (б) от степени отбора (θ) при разделении биосингаза различными мембранами

На таблице 3 видно, что концентрация СО₂ в пермеате повысилась по сравнению с концентрацией в исходной смеси. Следовательно, удаление СО₂ при использовании мембранного метода не возможно даже при организации второй стадии мембранного разделения. Расчеты показали, что применение полимерных мембран позволяет достичь концентрации Н₂ 88–93% только при низких степенях отбора (менее 20%).

Для дальнейшего эксперимента и расчетов были выбраны половолоконные мембраны GENERON®, характеризующиеся высокой селективностью по компонентам разделяемой смеси (Н₂/СО, Н₂/СН₄, Н₂/N₂).

Следует отметить, что рассчитанные значения составов газовых смесей в пермеате и ретенате отвечают идеальному случаю и не учитывают возможные отклонения, возникающие в условиях эксплуатации модулей, поэтому реальные значения могут отличаться на 5–20%. Для более точных расчетов нужно вводить дополнительные поправки, основанные на учете изменения давления вдоль мембраны, перемешивания в каналах и геометрии модуля.

Экспериментальное разделение четырехкомпонентной газовой смеси на модуле GENERON®.

С учетом возможных составов биоводорода и биосингаза (см. табл. 1) — 9–52,8% Н₂, 17–42% СО, 7–35% СО₂, 0–6,3% N₂, 1–15% СН₄, 0–1% Н₂S — для проведения экспериментального исследования была приготовлена смесь, моделирующая состав ее основных компонентов (Н₂/N₂/СО₂) и (Н₂/СО/СО₂): 38,9%He/1,4%Н₂/36,3%N₂/23,4%СО₂. Для обоснования замены Н₂ на He, а СО и СН₄ на N₂ был проведен предварительный расчет с привлечением ранее полученных данных (см. табл. 2) разделения исходной водородсодержащей и модельной смесей, который подтвердил возможность использования таких замен. На рисунке 3 представлены расчетные и экспериментальные зависимости концентрации компонентов в пермеате от степени отбора. Степень извлечения He и Н₂ составила более 90%. Отмечена симбатность изменения концентрация He и Н₂ в пермеате.

Данные экспериментов подтвердили, что извлечение Н₂ (He) высокой чистоты мембранным модулем при одностадийном разделении не возможно.

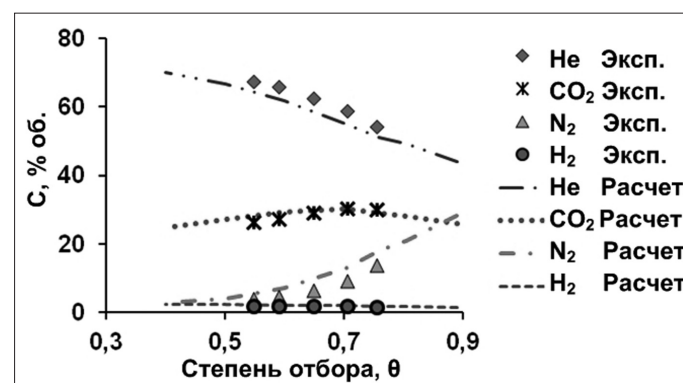


Рис. 3. Зависимость концентраций He, Н₂, СО₂, N₂ в пермеате от θ при разделении газовой смеси модулем GENERON®, перепад давления 4/1 атм

Как следует из рисунка 3, мембранный модуль GENERON® может быть успешно использован для предконцентрирования Н₂ до 68% и выше, что достаточно для возможности применения метода КЦА для дальнейшего концентрирования Н₂.

Зависимость величины адсорбции CO₂ от времени и объем пор углеродных адсорбентов при температуре 25 °С и давлении 1 атм

Адсорбент	Величина адсорбции, см ³ /г					Объем пор, см ³ /г		
	Время адсорбции, t, с					Микропор	Макро- и мезопор	Общий
	30	60	120	180	360			
УМСБАУ	34,9	35,4	35,5	35,5	35,6	0,15	0,04	0,19
СГАУ	33,9	38,9	40,8	42,7	44,0	0,50	0,93	1,43
СГМФ	27,3	29,0	31,5	32,3	37,8	0,50	0,34	0,84

Примечание: СГМФ — модифицированный фторопластом вариант СГАУ

Разделение четырехкомпонентной модельной смеси различными методами

Источник смеси	Состав газовой смеси, % об.			
	N ₂	CO ₂	H ₂	He
Исходная газовая смесь	36,3	23,5	1,3	39,4
Продукционный газ после модуля GENERON®	5,4	30,4	2,4	61,8
Продукционный газ после блока КЦА (без модуля GENERON®)	42,8	0,02	1,4	55,7
Продукционный газ после гибридного мембранно-адсорбционного стенда (с модулем GENERON®)	7,1	≤0,02	3,3	89,6

Разделение многокомпонентных газовых смесей методом КЦА. Характеристики некоторых исследованных адсорбентов приведены в таблице 4. В соответствии с таблицей 5 для использования в блоке КЦА были выбраны УМСБАУ и СГАУ, характеризующиеся обратимостью изотерм адсорбции, отсутствием петли гистерезиса и максимальными величинами адсорбции CO₂ при времени 30 сек., а также адсорбенты производства Германии «CarboTech MP».

Разделение трехкомпонентной газовой смеси в блоке КЦА. Экспериментально было изучено влияние типа адсорбента на эффективность работы блока КЦА и зависимость чистоты продукционного газа от следующих параметров: а) давления на входе; б) расхода входного ($Q_{вх}$), продувочного ($Q_{пр}$), сбросного и выходного потоков при постоянном давлении на входе; в) времени полуцикла при варьируемых значениях входного давления и расходов входного, сбросного, продувочного и выходного потоков в различных комбинациях, а также зависимости производительности и степени извлечения целевого компонента от требуемой чистоты продукционного газа

($Q_{пр}$). Были получены зависимости концентрации He и O₂ в продукционном газе от времени полуцикла при разделении смеси состава: 42,5%He/32%CO₂/25,5%O₂ при давлении 4 и 5 атм и различных отношениях $Q_{пр}/Q_{вх}$. В качестве примера на рисунке 4 представлены данные для адсорбента УМСБАУ.

Наибольшая концентрация He в целевом потоке составила 89,4%, при степени извлечения $\theta_{He}=10\%$ ($Q_{пр}/Q_{вх}=0,19$, $t_{ци}=16$ с). Концентрация CO₂ в целевом газе составляла 0,05–0,09%, для всех исследованных режимов работы блока КЦА. Эти значения хорошо согласуются с полученными ранее результатами по адсорбции CO₂ в статических условиях (см. табл. 4) и с данными литературы [22]. Найдено, что повышение степени извлечения по целевому компоненту и чистоты целевого газа может быть достигнуто оптимизацией следующих параметров: давления входной смеси, $t_{ци}$, величин и соотношения $Q_{вх}$, $Q_{пр}$, $Q_{сб}$, и скорости набора давления.

Разделение четырехкомпонентной газовой смеси в блоке КЦА. На рисунке 5 представлены полученные зависимости концентрации He, N₂ и H₂

в продукционном газе от времени полуцикла при разделении смеси состава 38,9%He/1,4%Н₂/36,3%N₂/23,4%СО₂. Операционные параметры: давление 5 атм, Q_{вх}=250–320 л/час, поток продукционного газа 40 л/час, адсорбент «CarboTech MP». Наибольшая концентрация He в целевом потоке составила 58,5%, при θ_{He}=35,5%; необходимо отметить, что при увеличении времени полуцикла с 20 до 80 секунд увеличивалась и степень извлечения целевого продукта с 25 до 35%. Концентрация СО₂ в целевом газе составляла менее 0,02%.

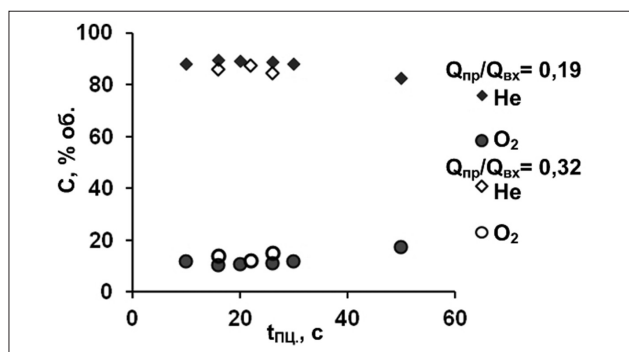


Рис. 4. Зависимость концентрации He и O₂ в продукционном газе от времени полуцикла (t_{пц}); Q_{вх}=200–900 л/ч, Q_{пр}=40 л/ч, P=5 атм

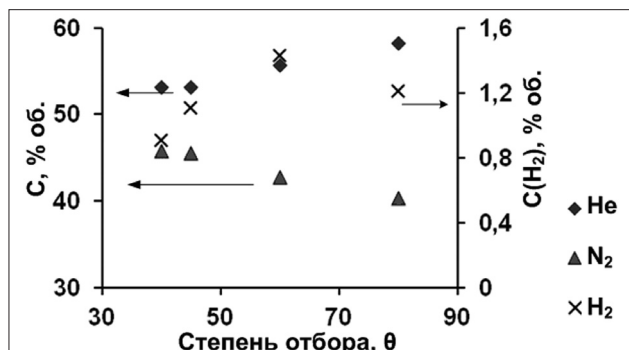


Рис. 5. Зависимость концентрации He, H₂ и N₂ в продукционном газе от времени полуцикла (t_{пц})

Таким образом, экспериментально доказано, что все исследуемые адсорбенты могут быть использованы для эффективного отделения He и H₂ от СО₂.

Разделение многокомпонентных газовых смесей мембранно-адсорбционными методами. В ходе эксперимента состав газовой смеси подаваемой в блок КЦА изменялся в зависимости от режима (без мембранного блока, с мембранным блоком, включающим разные модули); при этом другие рабочие параметры блока КЦА поддерживались неизменными. Зависимости выходной концентрации He и O₂ от времени полуцикла при разделении смеси состава: 42,5%He/32%СО₂/25,5%O₂

на блоке КЦА и комбинированном мембранно-адсорбционном стенде представлены на рисунке 6. На стадии мембранного разделения концентрация He в потоке пермеата повышается с 42,5 до 61% (см. рис. 1). Входные параметры процесса разделения в блоке КЦА: Q_{вх}=300–900 л/ч, Q_{пр}/Q_{вх}=0,19; с получением Q_{пр}=45,6 л/ч. При разделении гибридным мембранно-адсорбционным методом наилучшие характеристики продукционного газа были получены при t_{пц}=16 с (см. рис. 6). Половолоконный модуль (GENERON®) оказался более подходящим по сравнению с дисковым (ПВТМС) для комбинирования с блоком КЦА.

Были изучены зависимости выходной концентрации He от времени полуцикла при разделении смеси состава: 38,9%He/1,4%Н₂/36,3%N₂/23,4%СО₂ (% об.) на мембранно-адсорбционном стенде. Параметры процесса разделения блока КЦА: Q_{вх}=200–300 л/ч, Q_{пр}/Q_{вх}=0,23, с получением Q_{пр}=60 л/ч. Наилучшие характеристики продукционного газа были получены при t_{пц}=60 с. Сравнение характеристик разделения четырехкомпонентной смеси различными методами приведено в таблице 5.

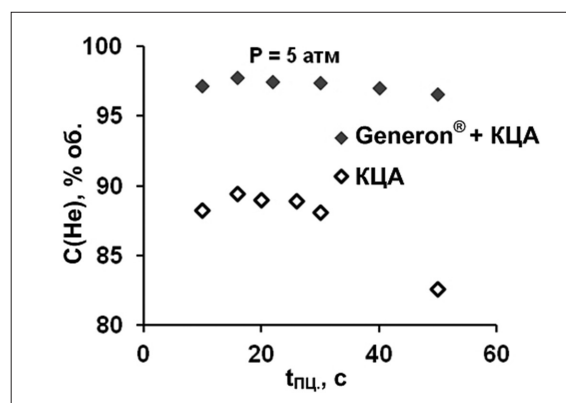


Рис. 6. Зависимость концентрации He в продукционном газе от времени полуцикла для разных методов разделения. P=5 атм

Из рисунка 6 видно, что характеристики разделения при применении гибридного мембранно-адсорбционного стенда (GENERON® + КЦА) для выделения He из тройной газовой смеси (He/СО₂/O₂) заметно выше, чем в случае использования отдельного мембранного или адсорбционного блоков. При этом можно добиться повышения концентрации целевого компонента (He) с 42,5 до 98,2% в продукционном газе и более высокой степени извлечения, по сравнению с адсорбционным способом разделения. Аналогично для случая выделения He из четырехкомпонентной газовой смеси (He/Н₂/СО₂/

N_2) (см. табл. 5); при этом можно добиться повышения концентрации He с 39,4 до 89,5% об., а H_2 с 1,3 до 3,3% об. (увеличение концентрации H_2 более чем в два раза) в продукционном газе с более высокой степенью извлечения, по сравнению с адсорбционным способом разделения.

Выявлено, что представленный гибридный стенд позволяет достигать чистоты продукционного газа более 93% об. даже при невысоких давлениях при использовании только одного адсорбента, тогда как в традиционных процессах выделения H_2 методом КЦА используются давления порядка 40–60 атм, не менее 4 адсорбционных колонн, содержащих 2–4 слоя различных адсорбентов, а в мембранных методах — 80–100 атм. При этом модули на основе полимерных мембран не используют в промышленности для выделения водорода из многокомпонентных газовых смесей, содержащих значительное количество CO_2 .

Заключение

Таким образом, в работе представлены результаты сравнения (в том числе расчетного) выделения водорода из газовых смесей, полученных в процессе пиролиза биомассы, с использованием коммерчески доступных мембранных модулей и процессов короткоциклового адсорбции. Проведены экспериментальные исследования по разделению модельных смесей на лабораторном мембранно-адсорбционном стенде. Показано, что для выделения H_2 из смесей с его содержанием до 50% возможно применение мембранного блока в качестве предконцентратора с последующим выделением H_2 при помощи КЦА.

Работа выполнена при поддержке Госконтракта № 16.516.11.61.39. Авторы выражают свою благодарность с.н.с., д.т.н. Передерий М.А., ФГУП «Институт горючих ископаемых» за предоставленные адсорбенты и оборудование для их исследования.

Литература

1. Бойченко В.А., Сатина Л.Я., Литвин Ф.Ф. Эффективность фотообразования водорода водорослями и цианобактериями // Физиология растений. — 1989. — Т. 36. — С. 239–247.
2. Василов Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 2: Биоэтанол // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 50–61.
3. Водород. Свойства, получение, хранение, транспортирование, применение: Справ. изд. / Гамбург Д.Ю., Семенов В.П., Дубровкин Н.Ф., Смирнова Л.Н. Под

ред. Д.Ю. Гамбурга, Л.Н. Смирнова. — М.: Химия, 1989. — 672 с.

4. Гасанова Л.Г., Садрадинова Э.Р., Нетрусов А.И., Тепляков В.В., Зенькевич В.Б., Модигель М. Мембранные биореакторы для получения горючих газов // Критические технологии. Мембраны. — 2007. — № 1(33). — С. 32–42.
5. Панцхава Е.С., Пожарнов В.А. В перспективе Россия — крупнейший поставщик биотоплива на мировой рынок // Энергия: экономика, техника, экология. — 2005. — Т. 6. — С. 10–19.
6. Тарасов Б.П., Лотоцкий М.В. Водород для производства энергии: проблемы и перспективы // Международный научный журнал «Альтернативная энергетика и экология» АЭЭ. — 2006. — № 8(40). — С. 72–90.
7. Тепляков В.В., Малых О.В., Амосова О.Л., Ястребов Р.А. Программа для ЭВМ «Расчет мембранного разделения многокомпонентных газовых смесей с использованием базы данных по мембранам с функцией расчетной оценки недостающих экспериментальных величин» // Свидетельство № 2011615930/ 28.07.2011.
8. Цыганков А.А. Получение водорода биологическим путем // Рос. Хим. Ж. (Ж. Рос. Хим. Об-ва им. Д.И. Менделеева). — 2006. — Т. 1. — № 6. — С. 26–33.
9. Яковлев А.В., Шалыгин М.Г., Матсон С.М., Хотимский В.С., Тепляков В.В. Парофазное выделение бутанола из разбавленных водных растворов с использованием мембран из высокопроницаемых стеклообразных полимеров // Мембраны и мембранные технологии. — 2011. — Т. 1. — № 14. — С. 305–312.
10. Alei G., Yanling H., Changli Q., Xing Y., Zhihua Z. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium* // Bioresource Technology. — 2010. — Vol. 101. — P. 4029–4033.
11. Cheng C.-L., Chung Y.L., Lee K.-S., Lee D.-J., Lin C.-Y., Chang J.-S. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock // Bioresource Technology. — 2011. — Vol. 102. — P. 8514–8523.
12. Cihce M.K., Dincer I., Rosen M.A. Thermodynamic analysis of hydrogen production from biomass gasification // International Journal of Hydrogen Energy. — 2010. — Vol. 35. — P. 4970–4980.
13. Demirbas A. Gaseous products from biomass by pyrolysis and gasification: effects of catalyst on hydrogen yield // Energy Conversion and Management. — 2002. — Vol. 43. — P. 897–909.
14. Dominguez A., Menendez J.A., Fernandez Y., Pis J.J., Valente Nabais J.M., Carrott P.J.M., Ribeiro Carrott M.M.L. Conventional and microwave induced pyrolysis of coffee hulls for the production of a hydrogen rich fuel gas // J. Anal. Appl. Pyrolysis. — 2007. — Vol. 79 — P. 128–135.

15. Dominguez A., Menendez J.A., Pis J.J. Hydrogen rich fuel gas production from the pyrolysis of wet sewage sludge at high temperature // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. – 2006. – Vol. 77. – P. 127–132.
16. Holladay J.D., Hu J., King D.L., Wang Y. An overview of hydrogen production technologies // *Catalysis Today*. – 2009. – Vol. 139. – P. 244–260.
17. Malych O.V., Golub A.Yu., Teplyakov V.V. Polymeric membrane materials: New aspects of empirical approaches to prediction of gas permeability parameters in relation to permanent gases, linear lower hydrocarbons and some toxic gases // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2011. – Vol. 164. – P. 89–99.
18. Ponamarev-Stepnoj N.N., Stolyarevsky A.Ya. Major aspects of the strategy of hydrogen based power development with nuclear energy sources / Presentation at the International Conference «Fifty Years of Nuclear Power – the Next Fifty Years», Obninsk, Russia, 29 June – 02 July 2004.
19. Qinglan H., Chang W., Dingqiang L., Yao W., Dan L., Guiju L. Production of hydrogen-rich gas from plant biomass by catalytic pyrolysis at low temperature // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2010. – Vol. 35. – P. 8884–8890.
20. Ritter J.A., Ebner A.D. State-of-the-art adsorption and membrane separation processes for hydrogen production in the chemical and petrochemical industries // *Separation Science and Technology*. – 2007. – Vol. 42(6). – С. 1123–1193.
21. Schnitzhofer W., Herzer S., Wukovits W., Ahner W., Friedl A., de Vrije T., Claassen P.A.M. Non-thermal production of pure hydrogen from biomass: A sustainable pathway to biological hydrogen // *Energy*. – 2008. – Vol. 25. – P. 115–123.
22. Separation Technology R&D Needs for Hydrogen Production in the Chemical and Petrochemical Industries. A Chemical industry Vision 2020 Initiative to help identify future R&D needs [Электронный ресурс]: www.chemicalvision2020.org URL: http://www.chemicalvision2020.org/pdfs/h2_report.pdf (дата обращения: 20.01.2011).
23. Widyawati M., Church T.L., Florin N.H., Harris A.T. Hydrogen synthesis from biomass pyrolysis with in situ carbon dioxide capture using calcium oxide // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2011. – Vol. 36. – P. 4800–4813.
24. Yeong W. T., Xiao J., Wen H., Bi K. L., Ching J. J., Jamaliah Md. J. Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple non-sulfur (PNS) bacteria // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2012. – Vol. 16. – P. 3117–3122.
25. Zabaniotou A., Ioannidou O., Antonakou E., Lappas A. Experimental study of pyrolysis for potential energy, hydrogen and carbon material production from lignocellulosic biomass // *Int. J. of Hydrogen Energy*. – 2008. – Vol. 33. – P. 2433–2444.

Список сокращений

БЭТ уравнение – уравнение Брунауэра – Эммета – Теллера.

КЦА – [безнагревная] короткоцикловая адсорбция.

ПВТМС – поливинилтриметилсилан.

СГАУ – сферический газовый активированный уголь.

ТБО – твердые бытовые отходы.

УМСБАУ – углеродные молекулярные сита на основе карбонизата бурого угля.

PECULIARITIES OF HYDROGEN-CONTAINING MULTICOMPONENT GAS MIXTURES SEPARATION OF BIOTECHNOLOGY WITH USING MEMBRANE/PSA METHODS

O.L. AMOSOVA^{1,2}, V.V. TEPLYAKOV²

¹ A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,

² M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The problems of hydrogen recovery from multicomponent gas mixtures assume the development of safe technologies with low energy consumption. This study is focused on the recovery of hydrogen from multicomponent gas mixtures by integrated membrane/PSA system. The paper presents the following results: computational estimation of the biosyngas ($H_2/CO/CO_2/N_2/CH_4/H_2S$) separation by means of membrane modules; experimental estimation of the integrated membrane/PSA system efficiency; experimental results of gas mixtures separation by the above mentioned integrated system with commercially available membranes (hollow fiber modules GENERON®, Air Products; disc membrane modules based polyvinyltrimethylsilane – PVTMS – and coil module based arilat-siloxane block copolymer). The experiments were carried out using model gas mixtures ($He/CO_2/O_2$ which imitates $H_2/CO_2/CO$ mixture and $He/H_2/CO_2/N_2$). It is shown that the membrane separation can be used as pre-concentration step for H_2 before PSA using to provide reasonable recovery of hydrogen from lower concentrated mixtures of bioorigin containing <50%.

Keywords: biohydrogen, biosyngas, cleaning gases.

СЕМАКС ПОЛОЖИТЕЛЬНО ВЛИЯЕТ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ КРЫСЫ РС12, НЕСУЩЕЙ МУТАНТНЫЙ ГЕН ПРЕСЕНИЛИНА-1 ЧЕЛОВЕКА

Е.В. НОВОСАДОВА¹, И.А. ГРИВЕННИКОВ^{1*}, И.В. БОБРЫШЕВА¹, А.П. ГРИГОРЕНКО^{2,3,4},
Л.А. АНДРЕЕВА¹, Е.И. РОГАЕВ^{2,3,4}, В.З. ТАРАНТУЛ¹

¹ ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН,

² ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН,

³ ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАМН, Москва;

⁴ Департамент психиатрии, Брудниковский институт нейropsychиатрических исследований, Медицинская школа Массачусеттского университета, Вустер, США

Ранее нами была получена трансгенная линия клеток феохромоцитомы крысы РС12, несущая мутантный ген пресенилина-1 человека (*hPS1*). В данной работе показана разная чувствительность трансгенной (M146V-poly) и контрольной линии клеток РС12 к действию апоптотических стимулов, в частности, к перекиси водорода. Так, при внесении 25 мкМ H₂O₂ количество жизнеспособных клеток в контроле составляло более 70%, а в трансгенной линии M146V-poly — только 40%. При добавлении 100 мкМ H₂O₂ количество жизнеспособных клеток в культуре M146V-poly было менее 5%, тогда как в контрольной линии достигало 35%. Проанализировано влияние ряда пептидов — Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Семакс), Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro — с потенциальным нейропротекторным действием на жизнеспособность контрольных и трансгенных клеток. Среди исследованных пептидов только Семакс достоверно увеличивал жизнеспособность клеток трансгенной линии M146V-poly и не оказывал значимого влияния на клетки контрольной линии РС12. Таким образом, полученная и исследованная нами *hPS1*-трансфицированная клеточная культура может представлять интерес как для дальнейшего изучения функций данного гена, так и в качестве модельной системы для поиска и тестирования лекарственных препаратов, которые могут быть эффективны для терапии ранней семейной формы болезни Альцгеймера, связанной с мутациями в генах пресенилинов.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, клетки РС12, ген пресенилина-1 человека, трансфекция, регуляторные пептиды.

Введение

Несмотря на прогресс современной медицины, достаточно большой спектр наследственно обусловленных мультифакторных заболеваний человека еще остается слабо изученным из-за сложной генетической составляющей этих патологий, а также из-за отсутствия адекватных моделей для их изучения и поиска новых лекарственных средств.

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее часто встречающееся нейродегенеративное заболевание людей

в среднем и пожилом возрасте. БА характеризуется тяжелыми расстройствами памяти, интеллекта, других когнитивных функций, а также серьезными проблемами в эмоциональной и поведенческих сферах. Установлено, что БА включает в себя несколько генетически гетерогенных форм. На основе данных близнецового анализа, изучения характера наследования и результатов анализа генов, вовлеченных в БА, определен вклад генетических факторов в патогенез различных клинических форм заболевания [12, 18]. Для семейных форм с ранним началом болезни (условно до 60 лет) характерен аутосомно-доминантный характер наследования, при котором причиной развития болезни является мутация в единственном гене. Мутации в гене, названном *hPS1*, вызывают заболевание к 30–60 годам; в течение 5–7 лет у пациента резко ухудшается память и происходит полная деградация личности. Никакие условия среды и внешние факторы не могут предотвратить или остановить болезнь.

В настоящее время не существует лекарственных препаратов, способных вылечить БА. Для создания

© 2012 г., Новосадова Е.В., Гривенников И.А., Бобрышева И.В., Григоренко А.П., Андреева Л.А., Робаев Е.И., Тарантул В.З.

* **Автор для переписки:**

Гривенников Игорь Анатольевич

зав. лабораторией, д.б.н, профессор

ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН

123182 Москва, площадь академика Курчатова, 2

Факс: +7 (499) 196-02-21

E-mail: igorag@img.ras.ru

такого лекарства необходимо использовать системный подход, который позволит влиять на первопричину заболевания, а не на его последствия. Для этого, в свою очередь, надо учитывать действия разных факторов, в том числе и мутации в генах, приводящих к БА. На уровне всего организма с учетом различных факторов проводить исследования затруднительно, поэтому в качестве альтернативной тест-системы можно использовать генетически измененные клеточные линии, несущие интересующие нас генные мутации. Культуры клеток легкодоступны для различных биохимических манипуляций. Есть возможность точно установить время контакта исследуемого вещества с клетками, проанализировать изменение его концентрации в течение определенного времени. Это позволяет получать достоверные значения скорости включения или метаболизма исследуемых соединений [6].

Одним из актуальных направлений современной нейробиологии является поиск и изучение веществ, стимулирующих когнитивные функции мозга, такие как внимание, познавательная деятельность, процессы обучения и памяти. Для лечения подобных нарушений широко используются ноотропные препараты. Однако известно, что ноотропные средства не лишены ряда недостатков, в частности, они оказались малоэффективными при лечении нарушений когнитивных функций, наблюдаемых при БА, шизофрении, некоторых психических и нейродегенеративных заболеваниях. В связи с этим возникла необходимость создания и изучения механизма действия веществ, обладающих не только ноотропной, но и нейропротекторной активностью [10].

В настоящее время определенный интерес представляют малоизученные пептиды — глипролины [1, 2, 4]. Глипролины обладают широким спектром физиологических активностей, представляющих большой практический интерес. В частности, они способны оказывать влияние на систему свертывания крови, модулируют работу иммунной и нервной систем [7, 11, 15]. Также разрабатывается и уже создан ряд комбинированных пептидов путем связывания биологически активных фрагментов пептидов/белков и коротких пептидов-глипролинов. Образующиеся в результате пептиды, как правило, обладают высокой устойчивостью к протеазам и сохраняют активности предшественников. Один из таких пептидов Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) является аналогом N-концевого фрагмента (4–10) адренокортикотропного гормона (АКТГ) [3]. В экспериментах на животных, а также в клинических исследованиях было установлено, что Семакс обладает

ярко выраженным ноотропным эффектом, а также оказывает значимое антиоксидантное, антигипоксическое, ангиопротекторное и нейропротекторное действие [8]. Кроме того, существенное нейропротекторное действие данного пептида было продемонстрировано в первичных нейрональных культурах, полученных из базальных ядер переднего мозга крысы [13].

Как упоминалось выше, исследования функций генов, ответственных за возникновение различных нейродегенеративных заболеваний, на уровне целого организма сейчас не представляются возможными. В связи с этим исследования в основном проводятся на культурах нервных и глиальных клеток, в том числе и генетически модифицированных генами, ответственными за развитие того или иного нейродегенеративного заболевания. Одной из известных и интенсивно используемых линий клеток для такого рода исследований служат клетки феохромоцитомы крысы PC12 [14]. Отличительной особенностью этих клеток является их способность к дифференцировке в нейрональном направлении в присутствии фактора роста нервов. В целом ряде исследований была показана идентичность процессов, происходящих в клетках PC12 и в нейронах при повреждении различными воздействиями [14, 16].

Ранее нами были получены поликлональная линия клеток PC12 (M146V-poly), трансфицированная геном *hPS1* с мутацией в 6 экзоне, приводящей к замене метионина на валин в 146 положении. Известно, что эта аминокислотная замена характеризуется аутосомно-доминантным наследованием и приводит к развитию наиболее агрессивной ранней семейной формы БА [5]. Получение такой линии клеток открывало возможность не только для исследования молекулярных и клеточных основ развития нейродегенерации альцгеймеровского типа, связанной с мутациями в гене пресенилина-1, но и для создания клеточной тест-системы для поиска соединений с нейропротекторной активностью.

Поэтому целью настоящей работы явилось исследование влияния ряда пептидов как с известными нейропротекторными свойствами Семакс, так и двух других пептидов Pro-Gly-Pro (PGP) и Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro (DPG) с неизвестными свойствами на рост и жизнеспособность трансгенной линии клеток феохромоцитомы крысы M146V-poly, экспрессирующей мутантный ген пресенилина-1 человека.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Работа проводилась на клетках феохромоцитомы крысы линии PC12 [14].

Клетки выращивали при 37 °С и 5% CO₂ на среде RPMI-1640 (ICN, США) с добавлением 15%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ICN, США) и 80 мкг/мл гентамицина.

Стабильно трансфицированные клеточные линии выращивали на аналогичной культуральной среде с добавлением селективного антибиотика G418 до конечной концентрации 0,5 мг/мл.

Анализ пролиферации клеток млекопитающих при добавлении перекиси водорода. Рост и гибель клеток определяли по изменению их числа, вычисляемого по показателям оптической плотности при добавлении МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромид) — витального реагента, имеющего тропность к митохондриям живых клеток [17]. Клетки рассеивались в среде, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки, по 30 тыс. на лунку 96-луночной плашки. Через 16 часов после посева вносили H₂O₂ в концентрации 25, 50 и 100 мкМ в соответствующие лунки и инкубировали 4 часа. Важно отметить, что H₂O₂ разводили непосредственно перед внесением в плашку. Показатели снимались после инкубации с 0,1 мг/мл МТТ в течение 4 ч с последующим 3-часовым лизисом и определением оптической плотности при 600 нм. Полученные в результате эксперимента значения соотносили с числом клеток по предварительно построенной калибровочной кривой.

Анализ жизнеспособности клеток при добавлении пептидов. Клетки рассеивались в среде, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки, по 30 тыс. на лунку 96-луночной плашки. Одновременно с посевом добавляли пептиды Семакс, РGР и DРG в концентрации 100 мкМ. Через 24 часа количество жизнеспособных клеток определяли по показателям оптической плотности при добавлении МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромид), как описано выше.

Анализ цитопротекторного действия пептидов при окислительном стрессе. Клетки рассеивались в среде, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки, по 30 тыс. на лунку 96-луночной плашки. Одновременно с посевом добавляли пептиды Семакс, РGР и DРG в концентрации 100 мкМ. Через 16 часов после посева вносили H₂O₂ в концентрации 25 мкМ и инкубировали 4 часа. Количество жизнеспособных клеток оценивали после инкубации с 0,1 мг/мл МТТ в течение 4 ч с последующим 3-часовым лизисом и определением оптической плотности при 600 нм. Полученные в результате эксперимента значения соотносили с числом клеток по предварительно построенной калибровочной кривой.

Синтез пептидов. Семакс, Рго-Gly-Рго и Рго-Gly-Рго-Рго-Gly-Рго были синтезированы Л.А. Андреевой в ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН. Чистота синтезированных пептидов была не менее 99%, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывались с помощью программ Statistica 7.0, Microsoft Excel. Достоверность различий групповых средних оценивалась с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверными считались значимости различий при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В работе была использована полученная ранее линия клеток феохромоцитомы крысы РС12, трансфицированная геном *hPS1*. Все эксперименты проводились на поликлональной линии M146V-poly, которая представляла собой суммарный пул из 300–400 клонов. Мы не случайно остановили свой выбор на поликлональной культуре. Ранее было показано, что количество трансгенного белкового продукта *hPS1* в индивидуальных клонах влияет на пролиферативную активность клеток. Другими словами, чем выше экспрессия трансгена *hPS1*, тем ниже пролиферативная активность клеток. Для того чтобы усреднить это влияние, мы использовали поликлональную культуру клеток M146V-poly. Вначале с помощью иммуоблоттинга мы проверили количество белкового продукта *hPS1* в трансфицированных клетках. Оказалось, что увеличение количества пассажей культивируемых клеток приводит к снижению экспрессии трансгена *hPS1*. Видимо, это происходит за счет отрицательной селекции клеток, несущих мутантный *hPS1*, жизнеспособность которых ниже, чем у исходной линии РС12 [5]. Полученные нами данные крайне важны для правильной оценки воздействия различных веществ на культуры трансгенных клеток. Все наши эксперименты проводились на ранних пассажах поликлональной культуры M146V-poly, для того чтобы исключить влияние снижения экспрессии трансгена *hPS1*.

Известно, что различные культуры клеток демонстрируют разную чувствительность к действию перекиси водорода [9]. Мы предположили, что трансгенная культура M146V-poly также может отличаться по чувствительности к перекиси водорода по сравнению с контрольными клетками. В качестве контроля были использованы исходные нетрансфицированные клетки РС12.

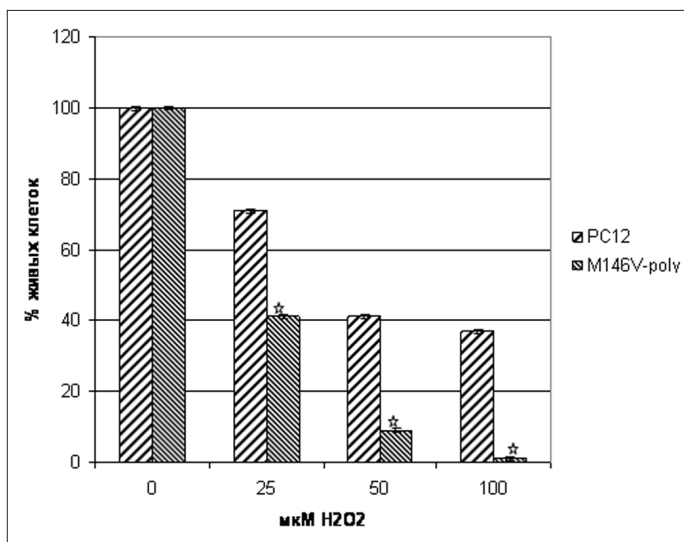


Рис. 1. Чувствительность исходной линии клеток PC12 и трансфицированной линии клеток M146V-poly к действию перекиси водорода. За 100% клеток принято количество жизнеспособных клеток без добавления H₂O₂. * p < 0,05

Как видно из рисунка 1, действительно клетки, несущие мутантный ген *hPS1*, демонстрировали более высокую чувствительность к действию H₂O₂, чем контрольная линия клеток. Так, при 4-часовой инкубации с 25 мкМ H₂O₂ количество жизнеспособных клеток в контроле составляло более 70%, а в линии M146V-poly — только 40%; с 50 мкМ H₂O₂ сохранялась примерно такая же разница между культурами и при инкубации с 100 мкМ H₂O₂ количество жизнеспособных клеток в культуре M146V-poly было менее 5%.

Для изучения цитопротекторного действия анализируемых пептидов мы выбрали концентрацию H₂O₂ 25 мкМ, при которой количество жизнеспособных клеток было не менее 40%.

На следующем этапе работы было исследовано действие изучаемых пептидов на жизнеспособность как трансгенной культуры M146V-poly, так и исходной клеточной линии PC12.

Как видно из гистограммы (рис. 2), даже в контроле без добавления пептидов количество живых клеток в трансгенной и исходной клеточных линиях отличается. Это говорит о том, что трансген *hPS1* негативно влияет на жизнеспособность клеток. Пептиды Семакс и PGP не оказывают влияния на клетки PC12, тогда как DPG статистически достоверно снижает количество живых клеток.

Другая картина наблюдалась в трансгенной линии M146V-poly. Семакс достоверно повышает количество живых клеток, PGP не оказывает значимого влияния, а

DPG так же, как и в клетках PC12, достоверно снижает количество живых клеток.

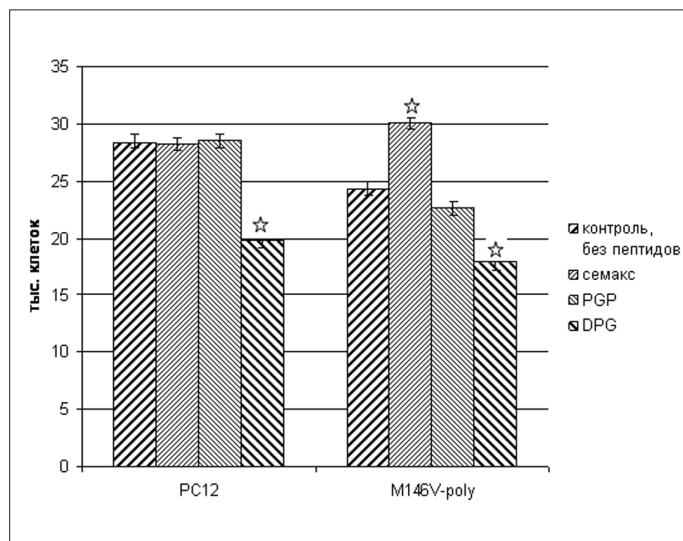


Рис. 2. Влияние пептидов Семакс, PGP и DPG на жизнеспособность исходной линии клеток PC12 и трансфицированной линии клеток M146V-poly. Пептиды использовали в концентрации 100 мкМ. * p < 0,05

Для оценки цитопротекторного действия пептидов использовали модель окислительного стресса. Для этого так же, как и при оценке жизнеспособности, клетки рассеивали с одновременным добавлением пептидов. Через 16 часов после посева в одну планшетку вносили 25 мкМ H₂O₂, тем самым стимулируя окислительный стресс, в другую, контрольную, — H₂O. Обе планшетки инкубировали 4 часа в CO₂-инкубаторе, затем проводили подсчет жизнеспособных клеток с помощью МТТ метода.

Пептиды Семакс и PGP не оказывают влияния на выживаемость клеток линии PC12 при окислительном стрессе, а пептид DPG статистически достоверно снижает количество живых клеток (рис. 3). Интересно — при введении пептидов в трансгенную культуру M146V-poly оказалось, что только Семакс достоверно увеличивает количество живых клеток, тем самым оказывая цитопротекторное действие, тогда как PGP и DPG не влияют на жизнеспособность клеток, несущих мутантный *hPS1* (рис. 4).

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что исходная клеточная культура PC12 и трансгенная линия клеток M146V-poly не одинаково чувствительны как к действию пептидов Семакс, PGP, DPG, так и к окислительному стрессу под действием перекиси водорода. Обращает на себя внимание разное действие Семакса на нормальные и трансгенные клетки. Так, например,

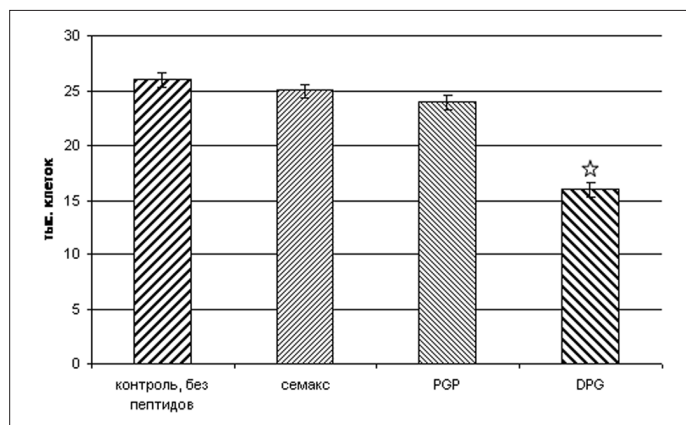


Рис. 3. Цитопротекторное действие пептидов при окислительном стрессе на клетки феохромоцитомы крысы PC12. Пептиды использовали в концентрации 100 мкМ. * $p < 0,05$

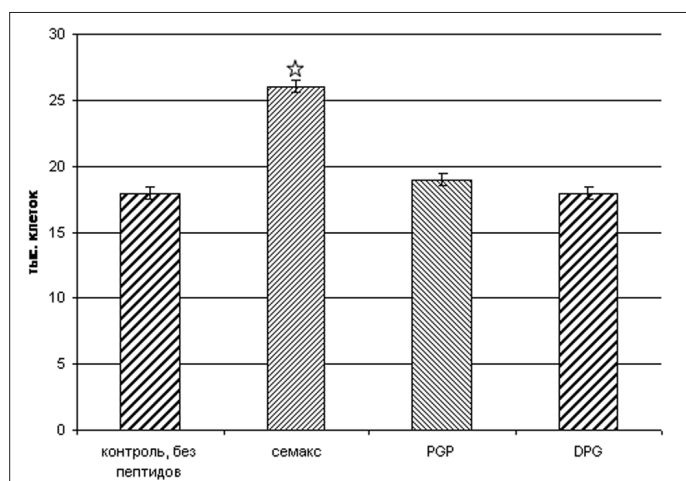


Рис. 4. Цитопротекторное действие пептидов на трансгенные клетки линии M146V-poly при окислительном стрессе. Пептиды использовали в концентрации 100 мкМ. * $p < 0,05$

данный пептид практически не оказывал влияния на жизнеспособность нормальных клеток феохромоцитомы крысы линии PC-12 как при их культивировании в стандартных условиях, так и в условиях окислительного стресса при добавлении в среду перекиси водорода в концентрации 25 мкМ.

В то же время Семакс существенным образом увеличивал выживаемость клеток трансгенной линии M146V-poly примерно на 25% по сравнению с контролем (без добавления пептида). Еще более заметный цитопротекторный эффект (от 40 до 50%) данный пептид оказывал на клетки трансгенной линии в условиях окислительного стресса.

Синтетический трипептид RGR, являющийся структурной частью пептида Семакса, в условиях наших

экспериментов не оказывал достоверных эффектов, как на нормальные, так и на трансфицированные клетки.

Следует отметить, что последовательность RGR вводилась в структуру эндогенных регуляторных пептидов, в частности, N-концевых фрагментов адренокортикотропного гормона, для повышения их устойчивости к действию протеаз и для увеличения времени их действия [6, 11]. Однако структурные изменения последовательности RGR, в частности, ее удлинение пептидом Pго-Gly-Pго (DPG), приводило к существенному негативному влиянию на жизнеспособность исследуемых клеток и при окислительном стрессе и при стандартных условиях культивирования.

DPG статистически достоверно снижал количество жизнеспособных клеток как в трансгенной линии M146V-poly, так и в контрольной линии клеток PC12. Эти данные показывают необходимость создания индивидуальных (для каждого заболевания) модифицированных клеточных тест-систем, которые позволяли бы проводить скрининг новых соединений на наличие нейропротекторной активности.

Заключение

Из полученных результатов можно сделать вывод, что клетки, несущие мутантный пресенилин hPS1, и исходная культура клеток PC12 отличаются по чувствительности к окислительному стрессу, а также по-разному реагируют на действие вносимых пептидов: Семакс, RGR и DPG.

Показано, что Семакс оказывает нейропротекторное действие только на трансфицированные клетки линии M146V-poly. Эти результаты подтверждают необходимость создания клеточных тест-систем с индивидуальными изменениями в геноме, характерными для каждого конкретного заболевания.

Полученная нами трансгенная поликлональная культура клеток M146V-poly, несущая мутантный трансген hPS1, представляет интерес как для дальнейшего изучения функций данного гена, так и в качестве модельной системы для поиска и тестирования лекарственных препаратов для терапии различных форм болезни Альцгеймера, особенно связанной с мутациями в генах пресенилинов.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института молекулярной генетики РАН «Центр клеточных и генных технологий». Иссле-

дование было поддержано грантами: Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.740.11.0171 и ГК № 16.512.11.2103), Российского фонда фундаментальных исследований – грант № 11-04-01337, а также ГК № 16.512.11.2102 и ГК № 16.512.11.2083 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

Литература

1. Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Самонина Г.Е. Глипролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов // *Вопр. биол. мед. фармацевт. химии.* – 2002. – № 1. – С. 24–27.
2. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е. Простейшие пролин-содержащие пептиды РG, GР, PGP и PPGG: регуляторная активность и возможные источники биосинтеза // *Биохимия.* – 1998. – Т. 63. – С. 134–141.
3. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф. и др. Ноотропный аналог адренокортикотропного гормона 4–10 – Семакс (Опыт 15 лет разработки и исследования). *Журн. высш. нерв. деят.* – 1997. – Т. 47(2). – С. 420–430.
4. Бакаева Э.В., Самонина Г.Е., Андреева Л.А., Золотарев Ю.А., Козик В.С., Ашмарин И.П., Мясоедов Н.Ф. Исследование фармакокинетики глипролина PGP при внутрижелудочном введении. // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2004. – Т. 4. – С. 57–60.
5. Бобрышева И.В., Григоренко А.П., Новосадова Е.В., Кальвина Н.Р., Арсеньева Е.Л., Гривенников И.А., Тарантул В.Э., Рogaев Е.И. Влияние изоформ пресенилина 1 человека на пролиферацию и выживаемость клеток феохромоцитомы крысы линии PC12 // *Биохимия.* – 2003. – Т. 68(6). – С. 750–758.
6. Гривенников И.А., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Антонов С.А., Кобылянский А.Г., Мясоедов Н.Ф. Применение первичных культур нервных и глиальных клеток млекопитающих для отбора соединений с нейропротекторной активностью // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* – 2011. – Т. 7(2). – С. 24–31.
7. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С. и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта // *Бюл. exper. биол.* – 1999. – Т. 128(10). – С. 411–413.
8. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – С. 249–251.
9. Одаева А.В., Исаев Н.К., Туровецкий В.Б., Каменский А.А. Нейропротекторное действие гептапептида семакс при H₂O₂-индуцированном повреждении клеток в культурах гиппокампа и септума крыс линии Вистар / Сб. статей конференции «Структурно-функциональные, нейрoхимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга». – М., 2007. – С. 458–462.
10. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2002. – Т. 65(5). – С. 66–72.
11. Пасторова В.Е., Ляпина Л.А., Ашмарин И.П. Предупреждение тромбообразования глипролинами на различных моделях предтромбоза и тромбоза у крыс // *Бюл. exper. биол. и мед.* – 2003. – Т. 138(10). – С. 364–367.
12. Рogaев Е.И. Генетические факторы и полигенная модель болезни Альцгеймера // *Генетика.* – 1999. – Т. 35. – С. 1558–1571.
13. Green L.A., Tischler A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1976. – Vol. 73(7). – P. 2424–2428.
14. Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Zolotarev Y.A., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Leacher L., Black I.B., Dreyfus C.F. Effects of behaviorally active ACTH (4-10) analogue – Semax on rat basal forebrain cholinergic neurons // *Restor. Neurol. Neurosci.* – 2008. – Vol. 26(1). – P. 35–43.
15. Lyapina L.A., Pastorova V.E., Samonina G.E., Ashmarin I.P. The effect of prolin-glycyl-proline (PGP) peptide and PGP-rich substances on haemostatic parameters of rat blood // *Blood Coagul. Fibrinol.* – 2000. – Vol. 11(1). – P. 1–6.
16. Mesner P., Winters T., Green S. Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC 12 cells resembles that in sympathetic neurons // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 119(6). – P. 1669–1680.
17. Shearman M.S., Ragan C.I. and Iversen L.L. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1994. – Vol. 91. – P. 1470–1474.
18. St. George-Hyslop P., Haines J., Rogaev E., Mortilla M., Vaula G., Roses A., et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14 // *Nat. Genet.* – 1992. – Vol. 2(4). – P. 330–334.

Список сокращений:

hPS1 – ген пресенилина-1 человека
 БА – болезнь Альцгеймера
 PGP – Pro-Gly-Pro
 DPG – Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro
 МТТ – 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромид

SEMAX POSITIVELY INFLUENCES THE VIABILITY OF TRANSGENIC PHEOCHROMOCYTOMA LINE PC12, CARRYING THE HUMAN PRESENILIN-1 MUTANT GENE (*hPS1*)

E.V. NOVOSADOVA¹, I.A. GRIVENNIKOV¹, I.V. BOBRY SHEVA¹, A.P. GRIGORENKO^{2,3,4},
L.A. ANDREEVA¹, E.I. ROGAEV^{2,3,4}, V.Z. TARANTUL¹

¹ *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,*

² *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences,*

³ *Mental Health Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;*

⁴ *University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA*

Previously we have derived a transgenic pheochromocytoma line PC12 bearing human mutant presenilin-1 gene. In current paper we have shown the differential sensitivity of transgenic (M146V-poly) and control PC12 cell lines to the action of apoptotic stimuli, such as hydrogen peroxide. Thus, application of 25 mcM of H₂O₂ the amount of viable cells in control lines were above 70%, while only 40% cells of M146V-poly line survived in the same conditions. After application of 100 mcM of H₂O₂ only 5% M146V-poly cells survived, while the control line survival was about 35%. We have analyzed the influence of several peptides (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Semax), Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro) with potential neuroprotective action on viability of control and transgenic cells. Among the investigated peptides only Semax demonstrated significant effect on cell survival. Therefore the *hPS1* transfected cell line we have constructed and investigated, might appeal both for research of current gene functions, as well as model system for search and screening of compounds, which can be effectively used for therapy of early Alzheimer's disease, related to presenilin mutations.

Keywords: Alzheimer's disease, PC12 cells, human presenilin 1 gene, transfection, regulatory peptides.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ КРИОСКОПИЧЕСКОГО МЕТОДА

С.И. НИФТАЛИЕВ¹, Е.П. ДУРИЦЫН², Р.В. КОРАБЛИН¹, Е.А. КОВЫРЯЛОВА^{1*}.

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий,

² Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко

Проведен мониторинг гидролиза лактозы при различных температурных режимах действия ферментов Lactozym 6500 L HP-G, Lactozym 3000 L HP-G, Lactozym 2600 L HP-G. Установлена зависимость между температурой заморозки раствора лактозы и степенью ее гидролиза.

Ключевые слова: гидролиз лактозы, β -галактозидаза, Lactozym 6500 L HP-G, криоскопия.

Введение

Целесообразность химической и биохимической трансформации лактозы обусловлена легкодоступностью и маловостребованностьюнутрицевтицески ценных продуктов вторичного молочного производства, а также возможностью внедрения безотходных технологий на предприятиях, обеспечением повышения качества выпускаемой продукции. Использование гидролиза лактозы дает возможность получения продуктов с пониженным содержанием молочного сахара и расширяет масштабы применения продукции функционального назначения.

В зависимости от технологической задачи необходимо создавать системы с оптимальными концентрациями гидролизованных продуктов. Для этого на каждом этапе процесса гидролиза проводится аналитический контроль состава гидролизата с помощью хроматографического, глюкозооксидантного и криоскопического методов.

Получение глюкозо-галактозного гидролизата из лактозы вторичного сырья осуществляется под действием ферментов β -галактозидаз, гидролитически отщепляющих концевые нередуцирующие остатки β -D галактозы

в β -галактозидах. Молочная сыворотка и сиропы гидролизованной лактозы имеют более низкую точку заморозки, чем дистиллированная вода, прежде всего, из-за содержания растворенных в ней минеральных солей. В связи с этим перспективно применение криоскопического метода контроля степени гидролиза лактозы за счет изменения температуры заморозки глюкозо-галактозного раствора в процессе гидролиза.

Материалы и методы

Лактоза — это дисахарид, который гидролизуется под действием β -галактозидазы в D-глюкозу и D-галактозу (рис. 1).

Нами были апробированы ферментативные препараты β -галактозидазы Lactozym Pure 6500 L, Lactozym Pure 2600 L, Lactozym Pure 3000 L, продуцентом которых является *Kluyveromyces lactis*. Гидролиз, проводимый под действием β -галактозидаз, контролировался криоскопическим методом.

В настоящее время классический метод Бекмана (ГОСТ 25101-82) по измерению температуры заморозки с помощью ртутных термометров вытеснился современными автоматическими приборами — криоскопами, используемыми в качестве датчиков температуры заморозки высокостабильные полупроводниковые термометры сопротивления.

Проводился направленный ферментативный гидролиз лактозы подсырной сыворотки с pH 6,2–6,3, что соответствует оптимуму действия ферментативных препаратов [2]. Количество вносимого фермента — 7500 LAU/дм³ (LAU — Lactase Activity Units). Пробы выдерживали при температурах 35, 37 и 42 °C в течение

© 2012 г., Нифталиев С.И., Дурицын Е.П.,

Кораблин Р.В., Ковырялова Е.А.

* Автор для переписки:

Ковырялова Екатерина Александровна
аспирант кафедры неорганической химии

и химической технологии Воронежского государственного университета инженерных технологий

Тел.: +7 (962) 329-17-87, +7 (473) 255-38-87

E-mail: katerina.koviryalova@gmail.com

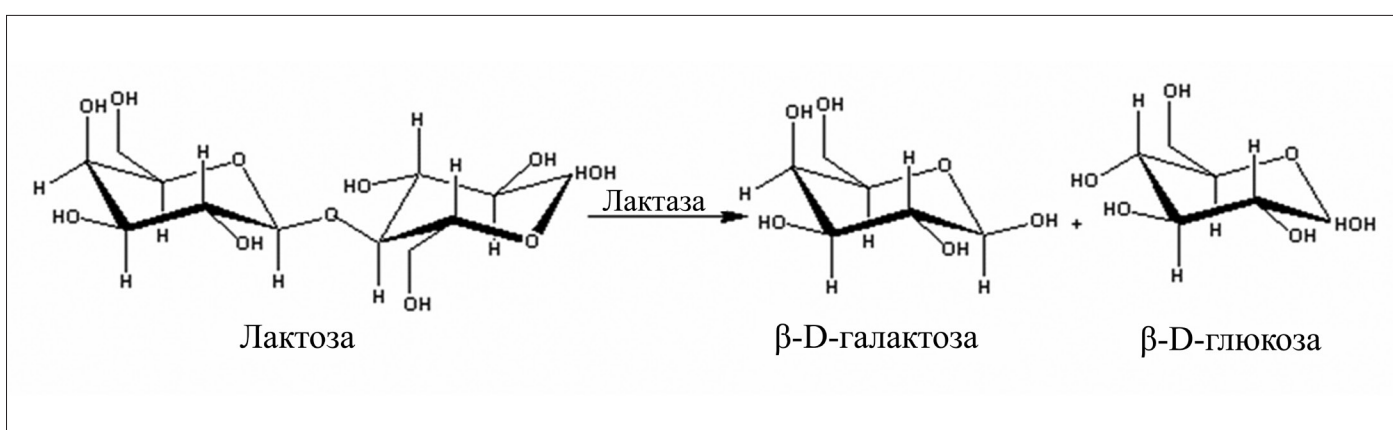


Рис. 1. Схема гидролиза лактозы

210 минут. Известно, что активность ферментных препаратов β -галактозидаз лежит в температурном диапазоне от 35 до 42 °С; выход за пределы указанных температур ведет к инактивации фермента [4].

Для проведения мониторинга активности ферментов Lactozym Pure исследовался гидролиз при инкубационных температурах 35, 37 и 42 °С.

Установлено, что оптимальные условия проведения гидролиза 37 °С и рН 6,2–6,3; они обеспечивают максимально возможный количественный выход галактозы и глюкозы, что подтверждает контрольный анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Методика определения степени гидролиза лактозы — (h): для установления точки замерзания гидролизата использовался стальной стакан вместимостью 500 см³, погруженный в пластиковую емкость. Стакан изолирован от стенок емкости термоизоляционным материалом. Внутри стакана приблизительно на 1/4 объема засыпались алюминиевые гранулы, после чего стакан заполнялся размолотым льдом.

Температура внутри стакана понижалась с помощью сжиженного азота. Латунная кювета заполнялась 3 см³ исследуемого гидролизата лактозы и крепилась на одном из двух зондов цифрового термометра Testo 735-2. Зонды погружались в термическую камеру со льдом и металлом. Термометр был запрограммирован на запись показаний температуры через каждые 10 секунд в собственную память. Результаты исследования обрабатывались в программе Testo Comfort — Software.

Согласно закону Рауля (1) и полученным данным о понижении точки замерзания глюкозо-галактозного раствора, на различных стадиях гидролиза рассчитывали моляльную концентрацию (M) и степень (h) гидролиза лактозы (2).

$$\Delta T = -K \cdot M \quad (1)$$

$$h = \frac{\Delta T \cdot M}{K} - 100 \quad (2)$$

где T — понижение точки замерзания; K — криоскопическая постоянная.

Параллельно каждые 30 минут проводился количественный анализ гидролизата, инкубированного при 37 °С, на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Varian 920-LC» с автоматическим вводом пробы, рефрактометрическим детектором Varian 356-LC; колонкой «Microsorb NH2 MV» 250×4,6 мм с сорбентом («Varian HPLC Columns Advanced Chromatography Solutions») зернением 5 мкм.

Результаты и обсуждение

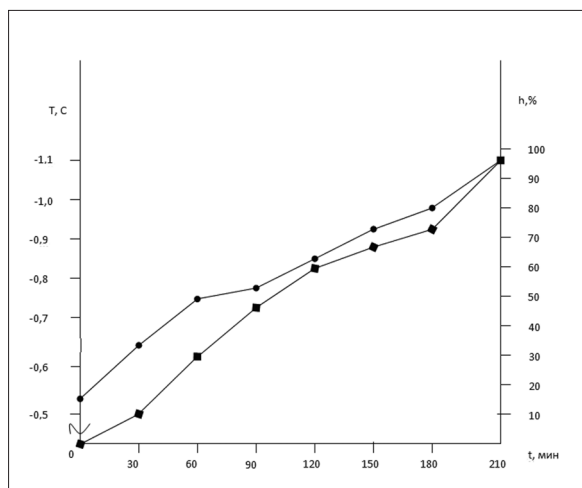
По экспериментальным данным построены графические зависимости степени гидролиза лактозы от времени и температуры замерзания (рис. 2 а–в).

Гидролиз лактозы проводился при температуре инкубации 37 °С.

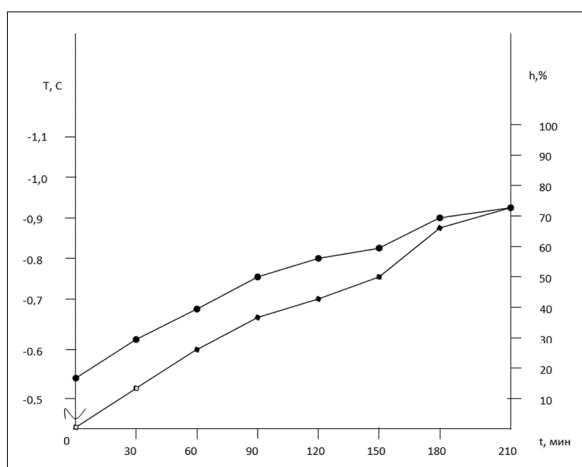
Увеличение степени гидролиза лактозы приводит к снижению температуры замерзания гидролизата (табл. 1).

Результаты параллельно проведенных исследований по количественному определению концентрации гидролизованных продуктов лактозы на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Varian 920-LC» коррелируют с данными, полученными при проведении криоскопического опыта (рис. 3). Степень гидролиза лактозы составляет 96%.

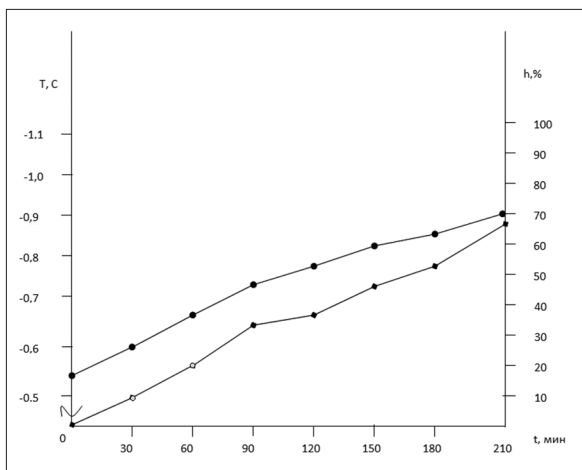
В процессе изучения оптимальных параметров действия ферментов было установлено, что изменение



а



б



в

Рис. 2. График зависимости степени гидролиза лактозы от времени и температуры замерзания, температура инкубации 37 °С (а – фермент Lactozym Pure 6500 L; б – фермент Lactozym Pure 3000 L; в – фермент Lactozym Pure 2600 L)

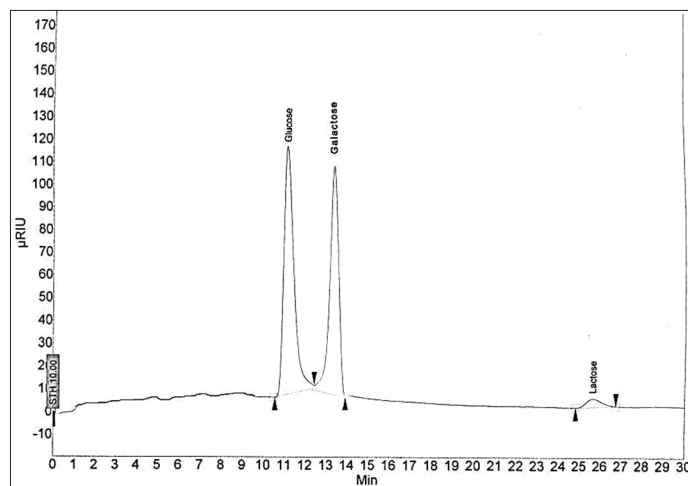


Рис. 3. Хроматограмма гидролизата лактозы ($t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,2-6,3$)

температуры гидролиза ниже 35 °С или выше 42 °С ведет к незначительному изменению температур замерзания гидролиза из-за малой активности фермента.

Изменение температур замерзания гидролизата под действием ферментных препаратов Lactozym 6500 L HP-G, Lactozym 3000 L HP-G, Lactozym 2600 L HP-G при температурах 35 и 42 °С отражено в таблицах 3 и 4. Параметры хроматографирования гидролизата лактозы представлены в таблице 2. Глюкоза и галактоза образуются в равных пропорциях.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод об оптимальных условиях проведения гидролиза 37 °С.

Заключение

Направленный гидролиз лактозы под действием ферментов галактозидаз Lactozym Pure 2600 L, Lactozym Pure 3000 L, Lactozym Pure 6500 L различной степени активности контролировался криоскопическим методом; тем самым были выявлены оптимальные параметры действия ферментных препаратов. Подтверждено, что увеличение степени гидролиза лактозы приводит к снижению температуры замерзания гидролизата.

Показатели степени гидролиза, определенные криоскопическим методом, коррелируют с данными, полученными в процессе количественного анализа гидролизата на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Varian 920-LC».

Обоснована возможность использования криоскопического метода в качестве экспресс-диагностики степени гидролиза лактозы в ультраfiltrате подсырной сыворотки.

Таблица 1

Параметры гидролиза лактозы в ультрафильтрате подсырной сыворотки при 37 °С с применением ферментов Lactozym Pure 6500 L, Lactozym Pure 3000 L и Lactozym Pure 2600 L

Время, мин.	Lactozym Pure 6500 L		Lactozym Pure 3000 L		Lactozym Pure 2600 L	
	ΔТ замерзания, °С	Степень гидролиза лактозы, %	ΔТ замерзания, °С	Степень гидролиза лактозы, %	ΔТ замерзания, °С	Степень гидролиза лактозы, %
Контроль	-0,544	0	-0,543	0	-0,544	0
30	-0,634	16	-0,609	12	-0,598	10
60	-0,717	32	-0,679	25	-0,658	21
90	-0,788	45	-0,750	38	-0,723	33
120	-0,859	58	-0,772	43	-0,739	36
150	-0,908	67	-0,815	50	-0,804	48
180	-0,935	72	-0,902	66	-0,821	51
210	-1,063	96	-0,903	71	-0,908	67

Таблица 2

Количественные и качественные параметры хроматографического анализа гидролизата лактозы

№	Углевод	Время удерживания, мин.	Высота пика, μRIU	Концентрация, г/дм ³ (при n=3 и ρ=0,95)
1	Глюкоза	11,63	120,1	82,1±0,29
2	Галактоза	12,40	113,4	82,0±0,26
3	Лактоза	26,51	9,7	8,1±0,15

Таблица 3

Температура замерзания гидролизата, инкубированного при 35 °С

Время, мин.	Т замерзания, °С		
	Lactozym Pure 6500 L	Lactozym Pure 3000 L	Lactozym Pure 2600 L
Контроль	-0,588	-0,588	-0,588
30	-0,639	-0,612	-0,605
60	-0,653	-0,637	-0,617
90	-0,674	-0,649	-0,621
120	-0,698	-0,654	-0,642
150	-0,719	-0,676	-0,667
180	-0,729	-0,689	-0,670
210	-0,732	-0,703	-0,673

Температура замерзания гидролизата, инкубированного при 42 °С

Время, мин.	Т замерзания, °С		
	Lactozym Pure 6500 L	Lactozym Pure 3000 L	Lactozym Pure 2600 L
Контроль	-0,589	-0,589	-0,589
30	-0,620	-0,598	-0,591
60	-0,629	-0,613	-0,609
90	-0,637	-0,622	-0,615
120	-0,653	-0,629	-0,620
150	-0,668	-0,638	-0,626
180	-0,673	-0,642	-0,634
210	-0,689	-0,653	-0,641

Литература

1. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
2. Грабчак С.Л., Иванова Л.С., Кричевская Г.В. Способ гидролиза лактозы в сывороточном концентрате // Агропром Украины. – 1990. – № 12. – С. 40–41.
3. Жеребцов Н.А., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. Биохимия: Учебник. – Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета, 2002. – С. 266–271.
4. Лактоза и ее производные / Синельников Б.М., Храмов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Серов В.А. – СПб.: Профессия, 2007. – 768 с.
5. Food Process Modelling / Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Ed. by L.M.M. Tijskens, M.L.A.T.M. Hertog, B.M. Nicolai. – Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cambridge, England, 2001. – 496 p.
6. Smart J. Lactose intolerance: Exploring reaction kinetics governing lactose conversion of dairy products within the undergraduate laboratory // Chemical Engineering Education. – 2008. – Volume 42. – Issue 2. – P. 82–90.
7. Zadow J.G. Whey and lactose processing. Chapter 10. Lactose hydrolysis. – London – New York: Elsevier applied science, 1992. – P. 361–409.

EVALUATION OF THE DEGREE OF HYDROLYSIS OF LACTOSE USING CRYOSCOPIC METHOD

S.I. NIFTALIEV¹, E.P. DURITSYN², R.V. KORABLIN¹, E.A. KOVRYALOVA¹

¹ Voronezh State University of Engineering Technology,

² N. Burdenko Voronezh State Medical Academy

The monitoring of lactose hydrolysis in the different temperature conditions of using β -galactosidase Lactozym 6500 L HP-G, Lactozym 3000 L HP-G, Lactozym 2600 L HP-G have been realized. Characteristic curve between lactose solution freezing point and degree of hydrolysis have been determined.

Keywords: hydrolysis of lactose, β -galactosidase, Lactozym 6500 L HP-G, cryoscopy.

СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Т.В. КРЫЛОВА*, Л.П. ЧИСТОХИНА, В.А. НЕСЧИСЛЯЕВ, А.М. НИКОЛАЕВА

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

Проведено исследование состава, физико-химических и биологических свойств ультрафильтратов культуральной жидкости бифидобактерий. Образцы получали на полволоконных разделительных аппаратах с номинальным пределом молекулярного задержания 15 и 100 кДа. Установлено разнонаправленное метаболическое действие на представителей симбионтной и условно патогенной микрофлоры макроорганизма.

Ключевые слова: бифидобактерии, ультрафильтрация, ультрафильтрат, метабиотик.

Введение

В последнее время активно развивается научная дисциплина, связанная с микробной экологией человека, — микробиотология. Данная сфера научных и практических знаний включает в себя исследование влияния живых пробиотических бактериальных клеток и продуктов их жизнедеятельности на макроорганизм. Доказано, что экзометаболиты представителей резидентной микрофлоры оказывают нормализующее влияние на микробиоценоз, угнетают рост патогенных и условно патогенных микробов, способствуют регенерации эпителия слизистой оболочки, стимулируют моторику кишечника и обладают иммуномодулирующим действием [2, 3, 4].

Цель настоящего исследования — провести сравнительный анализ метаболитных комплексов из культуральной жидкости (КЖ) производственного штамма *Bifidobacterium bifidum* 1. Известно, что бифидобактерии в процессе культивирования продуцируют в питательную среду биологически активные вещества, содержащие витамины (В1, В2, В6, В12, фолиевую кислоту и С), жирные кислоты, ферменты, бактериоцины и др. [3, 5]. Поэтому представляет интерес исследование состава и биологической активности вариантов ультрафильтратов (УлФ) из КЖ бифидобактерий с перспективой создания новых метаболитных пробиотиков.

Материалы и методы

Бактериальную взвесь бифидобактерий получали реакторным культивированием на казеиново-дрожжевой среде. Метаболитные комплексы выделяли из КЖ ультрафильтрацией на установке УПЛ-0,6 с использованием полволоконных разделительных аппаратов с различным номинальным пределом молекулярного задержания (НПМЗ) — 15 и 100 кДа.

Изучение полученных ультрафильтратов КЖ проводили регламентированными методами: концентрацию ионов водорода определяли по ГФ XII ч. 1 ОФС 42-0048-07 «Ионометрия» с. 89, значение плотности — ГФ XII ОФС 42-0037-07 «Плотность» методом 3 с. 40, значение вязкости — ГФ XII ОФС 42-0038-07 «Вязкость» с. 42. Белковый и общий азот — по ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских и иммунобиологических препаратов». Количество белка в исследуемых образцах устанавливали при помощи реактива Несслера по ГФ XII ОФС 42-0053-07 «Определение белка» с. 111. Ультрафиолетовые (УФ)-спектры поглощения изучали на СФ-2000 по ГФ XII ОФС 42-0042-07 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» с. 56.

Для микробиологических исследований использовали штаммы микроорганизмов: *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3, *Bifidobacteria bifidum* 1, *Esherichia coli lum+*. Определение влияния метаболитного комплекса на представителей индигенной микрофлоры включало в себя исследование активности кислотообразования и динамики роста культуры при внесении образца УлФ КЖ в количестве 10% от объема среды культивирования (раствор глюкозы 0,5% или обезжиренное молоко).

© 2012 г. Крылова Т.В., Чистохина Л.П., Несчисляев В.А., Николаева А.М.

* Автор для переписки:

Крылова Т.В.

младший научный сотрудник

614089 г. Пермь, ул. Братская, 177,

Тел.: +7 (3422) 62-32-75

E-mail: tv.krylova83@gmail.com

Активность кислотообразования бактериальных культур определяли титриметрическим методом согласно ФСП 42-05047224-05 «Бифидумбактерин сухой». Динамику накопления биомассы оценивали по изменению оптической плотности бактериальной взвеси в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм при 540 нм на КФК-2. Время и температура инкубации зависели от тест-штамма и составляли 24 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ для *L. plantarum* 8P-A3 и 72 ч при $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ для *B. bifidum* 1. Антимикробную активность в отношении условно патогенных микроорганизмов (УПМ) оценивали в тесте ингибирования биолюминесценции индикаторного штамма *E. coli lum+*. В ходе опытов регистрировали динамику интенсивности биолюминесценции бактерий тест-штамма в пробах с помощью люминометра «Биотокс-10М» (ООО «НЕРА-С», Россия). Относительную степень изменения интенсивности биолюминесценции опытной пробы по сравнению с контрольной выражали количественно в виде индекса антибактериальной активности (ИАА) по формуле:

$$\text{ИАА} = (I_k - I_o) / I_k \times 100\%,$$

где I_k — интенсивность биолюминесценции контрольной пробы (без ультрафильтрата с раствором натрия хлорида 0,9%); I_o — интенсивность биолюминесценции опытной пробы (с ультрафильтратом). Для статистической обработки экспериментальных данных использовали методы вариационной статистики [1]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты в таблицах представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены результаты физико-химических параметров УЛФ КЖ бифидобактерий. На основании полученных данных видно, что показатели рН, плотности и вязкости УЛФ КЖ 15 и 100 кДа не имеют статистически значимых отличий.

Таблица 1

Физико-химические параметры УЛФ КЖ бифидобактерий

Показатель	Фракция УЛФ КЖ бифидобактерий	
	15 кДа	100 кДа
рН	6,42±0,01	6,21±0,02
Кислотность, °Т	27,89±1,39	26,17±1,52
Плотность, г/см ³	1,011±0,01	1,011±0,01
Вязкость, мПа·с	1,1391±0,03	1,1391±0,02

Исследование спектральных характеристик в ультрафиолетовой области спектра метаболитных комплексов бифидобактерий 15 и 100 кДа показало, что они практически идентичны и имеют близкорасположенные максимум $261,2 \pm 0,1$ нм и минимум $241,2 \pm 0,6$ нм поглощения (рис. 1).

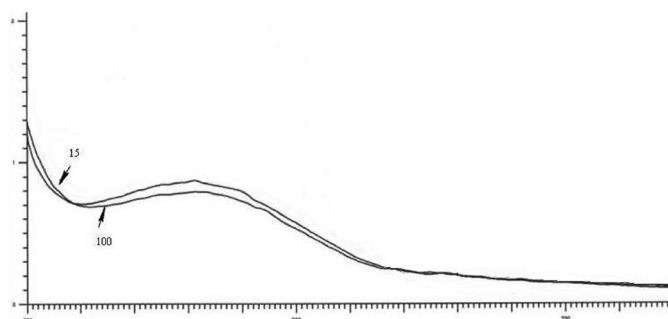


Рис. 1. УФ-спектр УЛФ КЖ бифидобактерий с НПМЗ 15 и 100 кДа

Определение количества азотсодержащих соединений в исследуемых образцах продемонстрировало, что концентрация белка, общего и белкового азота выше в УЛФ КЖ 100 кДа, что является вполне закономерным (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика состава УЛФ КЖ

Образец	Общий азот, мг/мл	Белковый азот, мг/мл	Белок, мг/мл
15 кДа	3,00±0,30	0,05±0,02	0,31±0,01
100 кДа	3,20±0,10	0,07±0,02	0,44±0,01*

Примечание: * $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с УЛФ КЖ 15 кДа

В ходе микробиологических исследований установлено стимулирующее влияние метаболитных комплексов бифидобактерий на рост и активность кислотообразования как лакто-, так и бифидобактерий (табл. 3). При этом в разных моделях экспериментов степень стимуляции различных тест-культур достоверно отличалась. Наиболее выражено влияние УЛФ бифидобактерий на активность кислотообразования штамма-продуцента. Величина прироста кислотности через 72 ч культивирования культуры *B. bifidum* 1 на обрате молока с добавлением метаболитных комплексов в 8 раз превышает контрольный показатель.

При оценке показателя накопления биомассы (коэффициент стимуляции роста) больший эффект выявлен в отношении культуры *L. plantarum* 8P-A3.

**Влияние УФ бифидобактерий на рост и активность кислотообразования
лакто- и бифидобактерий**

Среда культивирования	Тест-штамм	Контроль	УФ КЖ		
			15 кДа	100 кДа	
		Величина прироста оптической плотности, D 540 нм			
Раствор глюкозы	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	0,240±0,03	0,513±0,04*	0,490±0,02*	
	<i>B. bifidum</i> 1	0,250±0,02	0,500±0,03*	0,550±0,02*	
			Величина прироста кислотности, °Т		
	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	21,50±0,51	36,50±0,87*	31,23±0,54*	
	<i>B. bifidum</i> 1	3,80±0,02	8,02±0,27*	8,96±0,27*	
Обрат молока	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	59,46±1,41	76,50±2,58*	83,06±2,58*	
	<i>B. bifidum</i> 1	5,82±0,67	40,80±5,95*	41,64±3,85*	
Раствор глюкозы	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	Коэффициент стимуляции (КС) роста	2,52±0,29	2,44±0,22	
	<i>B. bifidum</i> 1		1,47±0,20	1,72±0,21	
Раствор глюкозы	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	КС кислотообразования	1,70±0,05	1,45±0,02(*)	
Обрат молока			1,29±0,04	1,40±0,06	
Раствор глюкозы	<i>B. bifidum</i> 1		2,42±0,05	4,16±0,67(*)	
Обрат молока			4,45±0,97	3,63±0,90	

Примечание: * $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем

Оценка антибактериальной активности метаболитных комплексов

ИАА, %			
Образцы ультрафильтратов		15 кДа	100 кДа
Цельный ультрафильтрат			
Время экспозиции, мин.	5	96,56±0,08	93,94±0,09
	60	95,57±0,05	95,83±0,08
	120	96,17±0,02	95,51±0,08
Ультрафильтрат, разведенный в 2 раза			
Время экспозиции, мин.	5	91,56±0,20*	76,43±0,49
	60	82,37±0,18*	77,63±0,24
	120	83,83±0,10*	72,20±0,06

Примечание: * $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с 100 кДа

Статистически значимых отличий по КС роста и КС кислотообразования (на оброте молока) УлФ с различным номинальным пределом молекулярного задержания в данном тесте не выявлено. При использовании раствора глюкозы КС кислотообразования лактобактерий достоверно больше в случае внесения 10% УлФ 15 кДа, а КС кислотообразования бифидобактерий – УлФ 100 кДа.

Исследование антимикробного влияния УлФ КЖ бифидобактерий на представителей УПМ в тесте ингибирования биолуминесценции показало, что более выраженным эффектом обладает метаболитный комплекс 15 кДа (табл. 4).

Заключение

При помощи полуволоконных разделительных аппаратов АР-0,2 с НПМЗ 15 и 100 кДа выделены и охарактеризованы по физико-химическим и биологическим показателям УлФ КЖ бифидобактерий. Полученные результаты являются необходимым экспериментальным

материалом для разработки нового класса пробиотических препаратов на основе биологически активных метаболитных комплексов бифидобактерий, позволяющих эффективно корректировать дисбиотические нарушения.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
2. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под ред. Ткаченко Е.И., Суворова А.Н. – СПб.: Спецлит, 2007. – 238 с.
3. Калмыкова А.И., Селятицкая В.Г., Пальчикова Н.А., Бгатова Н.П. Клеточные и системные механизмы действия пробиотиков. – Новосибирск, 2007. – 280 с.
4. Солливан А., Норда К. Место пробиотиков в терапии инфекций желудочно-кишечного тракта у человека // Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – № 3. – Т. 5. – С. 275–284.
5. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.3. Пробиотики и функциональное питание. – М.: Изд-во «Грантъ», 2001. – 287 с.

COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF METABOLITE COMPLEXES FROM THE CULTURE FLUID OF BIFIDOBACTERIA

T.V. KRYLOVA, L.P. CHISTOKHINA, V.A. NESCHISLYAEV, A.M. NIKOLAEVA

«Biomed» – Perm Branch of Federal State Unitary Company «Microgen», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Perm

Study of the composition, physico-chemical and biological properties of the culture fluid ultrafiltrate bifidobacteria was done. Samples were prepared for the separation of hollow units with a nominal molecular retention limit of 15 and 100 kD. Multidirectional metabolic effects on symbiotic and conditionally pathogenic bacteria in macroorganism was shown.

Keywords: bifidobacteria, ultrafiltration, ultrafiltrate, metabiotic.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ ХАРАКТЕРИСТИК РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ГЛУБИННЫХ КУЛЬТУР *B. ANTHRACIS* ДЛЯ КОНТРОЛЯ И ПРОГНОЗА ПРОЦЕССА СПОРООБРАЗОВАНИЯ

И.В. ДАРМОВ, С.А. ШВЕЦОВ*, И.Н. СЕДЕЛЬНИКОВ, А.Н. ШЕВЦОВ, Д.В. БОРОВСКОЙ,
К.Е. ГАВРИЛОВ, А.Н. МОШКОВ, В.В. ФОКИНА, Р.Ш. ЗИГАНШИН, Е.Ю. ВАХНОВ

Научно-исследовательский центр (войсковая часть 23527)

ФБУ «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт МО РФ», Киров

Представлены результаты исследований развития глубинной культуры *B. anthracis* на основе вакцинных штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4 с использованием регламентных и дополнительных показателей. Получены данные о структуре многофакторных отношений между регламентными параметрами процесса культивирования, характеристиками роста, спорогенеза и выходом спор в нативной культуре. Показано, что характеристики ростовых свойств и спорообразующей способности глубинной культуры обладают высокой информативностью и диагностической эффективностью, что позволяет использовать их в статистических моделях для контроля и прогноза концентрации спор в нативных культурах вакцинных штаммов *B. anthracis*.

Ключевые слова: *B. anthracis*, штаммы, питательные основы, развивающаяся глубинная культура, ростовые свойства, параметры кинетики роста, характеристики спорогенеза, нативная споровая культура, показатели выхода спор, стохастические модели.

Введение

Процессы приготовления сибиреязвенных вакцин, в частности, условия выращивания глубинных культур вакцинных штаммов *B. anthracis*, достаточно изучены и отработаны. Вместе с тем предвидеть конечный результат процесса культивирования — выход спор и полноту их формирования из вегетативных клеток — на сегодня не всегда представляется возможным. Последнее связано с особенностями развития глубинных культур и проблемами получения количественной информации о накоплении биомассы вегетативной и споровой форм клеток сибиреязвенного микроба традиционными методами.

Одним из основных количественных параметров развивающейся культуры спорообразующих микроорганизмов, в том числе *B. anthracis*, является накопление биомассы. Получение информации о накоплении биомас-

сы вегетативной и споровой форм клеток традиционными методами (по мутности культуральной жидкости и подсчету колоний на плотной питательной среде) сопряжено с определенными трудностями, которые обусловлены особенностями деления сибиреязвенного микроба. Сохраняя связь между собой, делящиеся клетки формируют цепочки, что не позволяет при высеве на плотную питательную среду получить колонии из одной клетки. Это же обстоятельство не дает возможность использовать в качестве эквивалента концентрации клеток в микробной культуре ее мутность, поскольку светорассеяние зависит от структуры популяции клеток, их показателя преломления, размера и формы. Кроме того, мутность служит отражением изменения биомассы клеток (сухих веществ), а соотношение между численностью и биомассой может существенно отличаться в зависимости от возрастных особенностей вегетативных клеток и от стадий споруляции.

Таким образом, актуальность исследований информативности показателей, характеризующих ростовые свойства глубинных культур *B. anthracis* и оценки их пригодности для контроля процесса культивирования и прогноза выхода спор, не вызывает сомнений.

С учетом изложенного целью настоящей работы являлось изучение информативности различных характеристик ростовых свойств глубинных культур *B. anthracis*

© 2012 г. Дармов И.В., Швецов С.А., Седельников И.Н., Шевцов А.Н., Боровской Д.В., Гаврилов К.Е., Мошков А.Н., Фокина В.В., Зиганшин Р.Ш., Вахнов Е.Ю.

* Автор для переписки:

Швецов С.А.

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник
НИЦ (в/ч 23527) ФБУ «33 ЦНИИИ МО РФ», Киров

Тел.: +7 (8332) 381527

E-mail: sergej.shwetsow@yandex.ru

для контроля и прогноза процесса спорообразования. Для достижения поставленной цели необходимо было исследовать:

- влияние индивидуальных штаммовых характеристик клеток *B. anthracis* и условий их выращивания на ростовые свойства глубинной культуры и выход спор;
- структуру и характер многофакторных отношений между показателями процесса культивирования, ростовыми свойствами глубинной культуры и выходом спор.

Материалы и методы

Объект исследования. В работе исследовали развивающиеся глубинные культуры *Bacillus anthracis* на основе штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4 [3].

Предмет исследования — оценка информативности показателей контроля процесса культивирования и характеристик роста глубинной культуры для прогноза выхода спор в нативных культурах *B. anthracis*. Информативность исследуемых характеристик роста оценивали по наличию их связи с показателями качества споровых нативных культур. Для этого применяли статистическое моделирование связей методом аналитических группировок.

Для воспроизведения максимально значимых различий нативных культур по выходу спор использовали глубинные культуры разных штаммов *B. anthracis*, питательные среды, приготовленные на разных питательных основах, и аппараты-культиваторы, отличающиеся конструкцией и вместимостью.

Было исследовано 24 серии глубинных культур *B. anthracis* на основе штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4, выращенных в аппаратах-культиваторах общей вместимостью 12 и 100 дм³, в питательных средах на основе кислотного гидролизата рыбкопной муки (КГРКМ) и аммиачно-казеиновой смеси (АКС).

Динамику потребления углеводов оценивали по продолжительности периода его полной утилизации ($T_{\text{ул}0}$). Динамику изменения концентрации водородных ионов в культуральной жидкости оценивали продолжительностью периода от момента начала культивирования до достижения культурой минимальной величины рН ($T_{\text{рНmin}}$) и ее наименьшему значению (рН_{min}). Динамику накопления биомассы вегетативных клеток оценивали по продолжительности периода от начала культивирования до достижения ее наивысшего значения ($T_{\text{Еmax}}$) и по ее максимальной абсолютной величине (E_{max}). Процесс

спорообразования оценивали по выходу спор, который характеризовали процентным содержанием спор в нативной культуре ($D_{\text{спр}}$) и их общей концентрацией ($\text{ОК}_{\text{спр}}$), концентрацией живых спор в нативной культуре ($\text{КОЕ}_{\text{спр}}$) и их процентным содержанием ($\text{ДЖ}_{\text{спр}}$).

Концентрацию углевода в питательной среде определяли с помощью прибора «Энзискан Ультра», позволяющего количественно оценивать молярную концентрацию глюкозы в биологических жидкостях. Биомассу вегетативных клеток контролировали нефелометрическим методом по мутности микробной культуры. Соотношение вегетативных клеток и спор в культуре, их морфологию и наличие ПМФ определяли микроскопией мазков, окрашенных по Циллю — Нильсену и по Граму. Общую концентрацию спор устанавливали методом прямого счета в камере Горяева. Концентрацию живых спор ($\text{КОЕ}_{\text{спр}}$) определяли высевом на поверхности плотной питательной среды, а процентное их содержание ($\text{ДЖ}_{\text{спр}}$) рассчитывали из отношения $\text{ДЖ}_{\text{спр}}/\text{ОК}_{\text{спр}}$.

Для характеристики ростовых свойств глубинной культуры использовали параметры кинетики роста популяции вегетативных клеток *B. anthracis* и формирования из них спор. Для расчета кинетических параметров развития глубинной культуры применяли фотометрический метод регистрации плазмолитической реакции жизнеспособных вегетативных клеток в осмотически активных средах [2, 4]. Данный метод позволяет по разности величин оптической плотности взвеси живых микробов в гипертоническом (E_{NaCl}) и изотоническом ($E_{\text{сах}}$) растворах: $\Delta E = E_{\text{NaCl}} - E_{\text{сах}}$ (далее осмотический эффект — ООЭ), рассчитывать накопление и убыль осмотически активных клеток в фазе вегетативного развития глубинной культуры и в фазе спорогенеза, соответственно.

Применялся метод рефрактометрии [4].

Снижение величины ΔE в спорующейся культуре представляется отражением двух явлений: с одной стороны, это гибель и лизис накопленной биомассы вегетативных клеток, с другой — увеличение в популяции доли проспор и спор. Для описания этого явления предложен показатель убыли осмотически активных клеток ($V_{\Delta E_{\text{убл}}}$).

Выявление стохастических связей между контролируемыми параметрами роста глубинной культуры и показателями выхода спор в нативной культуре проводили методом статистической группировки единиц совокупности данных измерений по факторному признаку. Для каждой группы результативного признака вычисляли среднее значение и среднее квадратическое отклонение. Для оценки существенности различий между группами по величине результативного признака использовали кри-

терий Фишера. Степень влияния факторного признака на результативный оценивали по величине коэффициента детерминации (η^2).

Результаты и обсуждение

В таблицах 1–3 приведена статистика результатов определения характеристик роста глубинной микробной культуры *B. anthracis* штаммов СТИ-ПР-4 и СТИ-1 и выход спор в нативной культуре по группам, сформированным в соответствии со следующими факторными признаками: исследуемый штамм; используемая для приготовления среды выращивания питательная основа и вместимость аппарата-культиватора.

Сравнительная оценка ростовых свойств глубинных культур на основе штаммов СТИ-ПР-4 и СТИ-1. Статистическая сводка и группировка значений исследуемых показателей роста, результаты которой представлены в таблице 1, позволила оценить влияние индивидуальных штаммовых характеристик на выход спор у нативных культур штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4. Выход спор в нативных культурах на основе штамма СТИ-1 и СТИ-ПР-4 составил по показателю общей концентрации спор ($OK_{\text{спр}}$) 1,8 и 0,6 млрд. спор·см⁻³, соответственно; по концентрации жизнеспособных спор ($KOE_{\text{спр}}$) – 1,2 и 0,5 млрд. спор·см⁻³, соответственно; по доле спор в нативной культуре ($D_{\text{спр}}$) – 85 и 38%, соответственно; по доле живых спор ($ДЖ_{\text{спр}}$) – 70 и 58%, соответственно. Так как фактические значения критерия Фишера вышеперечисленных показателей больше табличного ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{табл.}}$), влияние индивидуальных штаммовых характеристик на выход спор в нативных культурах признано существенным. Величина эмпирического коэффициента детерминации, рассчитанная для $OK_{\text{спр}}$, $KOE_{\text{спр}}$, $D_{\text{спр}}$ и $ДЖ_{\text{спр}}$ и представляющая собой отношение межгрупповой вариации (дисперсии) к общей ($\eta^2 = W_{\text{м/гр}} / W_{\text{общ}}$), указывает, что индивидуальные штаммовые характеристики детерминируют различия между нативными культурами по указанным показателям на 43,7, 39,8, 30,9 и 43,7%, соответственно.

Также на основании критерия Фишера признано существенным влияние особенностей исследованных штаммов на развитие глубинной культуры по 7 из 10 показателей характеристик роста, определяемым осмооптическим методом и по 2 из 5 традиционным показателям. Так, в фазе вегетативного развития влияние индивидуальных штаммовых характеристик на время утилизации углевода ($T_{\text{угл}}$) составляет 46,6%, на продолжительность периода снижения концентрации ионов водорода до кри-

тических (минимальных) значений (T_{pHmin}) – 55,1%, на продолжительность ($T_{\text{ген}}$) и число генераций популяции клеток ($N_{\text{ген}}$) – 11,7 и 12,8%, на относительную скорость накопления биомассы вегетативных клеток (μ) – 9,1%. В фазе спорообразования величина влияния для показателя, характеризующего продолжительность периода достижения ООЭ максимальных значений ($T_{\Delta E_{\text{max}}}$ – время начало процесса формирования спор), составляет 14,9%; для скорости снижения величины ООЭ культуры ($V_{\text{убл.}}$ – скорость процесса формирования спор) – 13,8%; для показателя, характеризующего минимальный уровень ООЭ культуры на момент остановки аппарата (ΔE_{min} – эффективность процесса спорообразования), – 10,3% и для продолжительности культивирования ($T_{\text{min.}}$) – 11,7%.

По показателям, определенным осмооптическим методом, растущую в питательной среде на основе КГРКМ глубинную культуру штамма СТИ-ПР-4 от культуры штамма СТИ-1, в фазе ее вегетативного развития, отличали: более продолжительные период достижения максимальной величины ООЭ и время одной генерации клеток штамма СТИ-ПР-4; меньшие абсолютная и относительная скорости накопления биомассы вегетативных клеток, меньшее число генераций популяции клеток.

В фазе образования спор для глубинной культуры штамма СТИ-ПР-4 характерны более позднее по сравнению с культурой на основе штамма СТИ-1 начало и меньшая скорость убыли осмотически активных клеток. Данные о продолжительности генерации и скорости нарастания биомассы вегетативных клеток, а также о времени начала и скорости формирования из них спор свидетельствуют о более высоких ростовых свойствах глубинных культур на основе клеток штамма СТИ-1 и способности их клеток к спорообразованию по сравнению с глубинными культурами на основе штамма СТИ-ПР-4.

Сравнительная оценка ростовых свойств глубинных культур штаммов СТИ-ПР-4 и СТИ-1 по осмооптическим показателям согласуется с результатами аналогичных исследований процесса выращивания штаммов традиционными способами. В глубинной культуре штамма СТИ-ПР-4 время полной утилизации клетками углевода из питательной среды (на основе КГРКМ), период снижения концентрации ионов водорода до минимальных значений и время накопления максимальной величины биомассы были более продолжительными, а уровень максимальной величины биомассы был несколько ниже, чем в глубинной культуре на основе штамма СТИ-1.

Параметры распределений показателей роста глубинной культуры *V. anthracis* штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4 при культивировании в ПС на основе КГРКМ (для $F_{\text{табл.}} = 3,40$)

Штамм	Показатели, определенные осмооптическим методом										Традиционные показатели									
	Параметры кинетики роста клеток микробной популяции					Физико-химические					Биологические									
	ΔE_{max} , ед. экст.	T_{max} , ч	ΔE_{min} , %	T_{min} , ч	V_{max} , млрд.кл. см ⁻³ ч ⁻¹	μ , ч ⁻¹	$X_{\text{РБКос}}$, млрд. кл. см ⁻³	$N_{\text{ген}}$, шт.	$T_{\text{ген}}$, ч	$V_{\Delta E_{\text{бд}}}$, % ч ⁻¹	$T_{\text{увд}}$, ч	ρH_{min} , ед. рН	$T_{\text{рНmin}}$, ч	E_{max} , усл. ед.	T_{max} , ч	ОК _{спр.} , млрд. спор. см ⁻³	КОЕ _{спр.} , млрд. спор. см ⁻³	$D_{\text{спр.}}$, %	$\frac{\text{КОЕ}_{\text{спр.}}}{\text{ОК}_{\text{спр.}}}$, %	
\bar{X}	4,6	16	0,1	40	0,47	0,79	2,2	4,4	2,7	-4,5	12,0	5,8	6	8540	18	1,8	1,2	85	70	
σ	1,9	0,0	0,0	11,3	0,28	0,16	0,9	0,6	0,4	5,7	0	0,2	2,8	481	0,4	0,0	0,0	7,1	17	
\bar{X}	4,8	21	19,8	54	0,40	0,64	2,3	3,8	4,7	-3,8	16,4	5,8	15	7250	0,6	0,5	38	58		
σ	2,6	6,8	31,9	30,5	0,42	0,39	1,2	1,1	3,7	3,1	2,587	0,6	4,5	3938	0,7	0,5	37,8	16		
$F_{\text{факт.}}$	0,34	4,71	4,34	4,26	0,12	4,29	0,01	4,41	4,23	4,22	16,6	0,1	23,3	0,6	14,7	12,6	8,5	0,36		
η^2	-	14,9	13,8	10,3	-	9,1	-	12,8	11,7	11,7	46,6	-	55,1	-	43,7	39,8	30,9	-		

Примечания: \bar{X} — среднее арифметическое значение; σ — квадратичное отклонение среднего значения; $F_{\text{факт.}}$ — фактическое значение критерия Фишера; η^2 — эмпирический коэффициент детерминации; «-» — значение не рассчитывали

Параметры распределений показателей роста глубинной культуры *V. anthracis* штамма СТИ-ПР-4 при культивировании в АКС и ПС на основе КГРKM (для $F_{табл.} = 3,40$)

Питательная основа	Показатели, определенные осмоптическим методом										Традиционные показатели									
	Параметры кинетики роста клеток микробной популяции					Физико-химические					Биологические									
	$\Delta E_{max}'$, ед. экст.	$T_{\Delta E_{max}'}$, ч	$\Delta E_{min}'$, %	$T_{\Delta E_{min}'}$, ч	V_{max}' , млрд.кл. см ⁻³ ·ч ⁻¹	μ , ч ⁻¹	$X_{РБКоор}'$, млрд. кл.·см ⁻³	$N_{ген}'$, шт.	$T_{ген}'$, ч	$V_{\Delta E_{об.}}'$, %·ч ⁻¹	$T_{урч0}'$, ч	$\rho H_{min}'$, ед.рН	$T_{Рmin}'$, ч	E_{max}' , усл.ед.	T_{max}' , ч	$OK_{сп.}$, млрд. спор·см ⁻³	$KOE_{сп.}$, млрд. спор·см ⁻³	$D_{сп.}$, %	$\frac{KOE_{сп.}}{OK_{сп.}}$, %	
КГРKM	\bar{X}	4,8	21	19,8	54	0,40	0,64	2,3	3,8	4,7	-3,8	16,4	5,8	15	7250	21	0,6	0,5	38	69
	σ	2,6	6,8	31,9	30,5	0,42	0,39	1,2	1,1	3,7	3,1	2,587	0,6	4,5	3938	6,9	0,7	0,5	37,8	16
АКС	\bar{X}	5,1	32	0,3	144	0,15	0,31	2,3	3,5	7,1	-2,23	18,7	5,3	20	5467	23	0,9	0,4	37	48
	σ	0,8	10,6	0,5	0,0	0,066	0,167	1,1	1,2	2,3	0,8	2,309	0,2	4,0	611	6,1	0,7	0,4	25,2	21
$F_{факт.}$		0,1	12,0	4,2	53,7	4,45	7,3	0,1	0,4	4,63	4,51	4,9	5,3	6,0	1,2	0,17	3,53	0,02	0,01	3,7
η^2		-	37,5	13,6	72,9	13,3	21,9	-		14,6	11,4	20,0	20,8	23,1	-	-	8,9	-	-	9,4

Примечания: \bar{X} — среднее арифметическое значение; σ — квадратичное отклонение среднего значения; $F_{факт.}$ — фактическое значение критерия Фишера; η^2 — эмпирический коэффициент детерминации; «-» — значение не рассчитывали

Параметры распределений показателей роста глубинной культуры *V. anthracis* для штамма СТИ-ПР-4 при культивировании в ПС, приготовленных на основе КГРКМ, в аппаратах-культиваторах общей вместимостью 12 и 100 дм³ (для F_{таб.} = 3,40)

Общая вместимость, дм ³	Показатели, определенные осмооптическим методом										Традиционные показатели								
	Статистики				Параметры кинетики роста клеток микробной популяции						физико-химические				биологические				
	ΔF_{max} , ед. экст.	T_{max} , ч	ΔF_{min} , %	T_{min} , ч	V_{max} , млрд. кл. см ³ · ч ⁻¹	μ , ч ⁻¹	X_{PBK003} , млрд. кл. см ⁻¹	$N_{ген}$, КОА-ВО	$T_{ген}$, ч	$V_{\Delta E_{yca}}$, ед. экст · ч ⁻¹	$T_{yca,0}$, ч	ρH_{min} , ед. рН	T_{min} , ч	E_{max} , усл. ед.	T_{max} , ч	$OK_{сп}$, млрд. спор · см ⁻³	$КОЕ_{сп}$, млрд. спор · см ⁻³	$\Delta_{сп}$, %	$\frac{КОЕ_{сп}}{OK_{сп}}$, %
12	\bar{X}	5,9	24,0	1,6	79,1	0,55	2,6	4,3	4,1	-3,6	17,2	5,8	15,5	8121	22,4	1,2	0,7	68,8	66
	σ	2,2	8,6	2,9	45,9	0,38	1,3	1,1	1,7	1,5	2,8	0,6	5,8	3854	5,9	0,7	0,5	30,4	0,2
100	\bar{X}	4,2	22,9	35,0	52,9	0,19	2,0	3,0	6,6	-4,3	16,7	5,8	15,9	7095	20,2	0,6	0,4	31	58
	σ	2,7	9,1	39,5	38,8	0,24	1,3	1,0	5,2	4,3	2,6	0,7	4,6	4057	7,2	0,4	0,4	17,5	22
F _{факт.}	1	0,02	4,2	3,4	3,5	0,8	0,9	3,7	3,6	0,6	0,02	0	0,1	0,7	0,33	3,6	3,7	5,9	0,38
η^2	-	-	29,7	19,5	21,9	-	-	24,9	19,8	-	-	-	-	-	-	30,8	25,0	42,6	-

Примечания: \bar{X} — среднее арифметическое значение; σ — квадратичное отклонение среднего значения; F_{факт} — фактическое значение критерия Фишера; η^2 — эмпирический коэффициент детерминации; «-» — значение не рассчитывали

Более низкая способность к росту и спорообразованию глубинной культуры на основе клеток штамма СТИ-ПР-4 нашла свое выражение в более низком содержании спор у нативной культуры. Согласно характеристикам процесса развития и спорообразования глубинной культуры, полученным с помощью осмооптических показателей, более высокие концентрации спор в нативной культуре штамма СТИ-1 (при равных значениях равновесной концентрации вегетативных клеток — $X_{p_{K_{000}}}$) могут быть обусловлены более ранним началом изменений в клетках этого штамма, связанных с образованием спор, и большей, чем у клеток штамма СТИ-ПР-4, скоростью их формирования. На это указывают время достижения максимальной величины ООЭ глубинной культуры ($T_{\Delta E_{max}}$) и скорость его снижения ($V_{\Delta E_{убл}}$). Для глубинной культуры штамма СТИ-1 время достижения максимальной величины ООЭ глубинной культуры составляло 16 ч, а для глубинной культуры штамма СТИ-ПР-4 — 21 ч.

Начальная скорость спорогенеза ($V_{\Delta E_{убл}}$) составила 9,0 процентов в час⁻¹ и 7,5 процента в час⁻¹, соответственно. В результате на момент остановки аппарата-культиватора величина ООЭ нативной культуры штамма СТИ-1 составила 0%, а нативной культуры штамма СТИ-ПР-4 — 20%, что свидетельствует в первом случае об отсутствии, а во втором — о наличии в культуральной жидкости осмотически активных клеток. Полученные данные согласуются с результатами определения полноты спорообразования. Доля спор в нативных культурах на основе штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4 составила 85 и 38%, соответственно. Последнее говорит о том, что вегетативные клетки в нативных культурах на основе штамма СТИ-ПР-4 составляли более 50%.

Сравнительная оценка ростовых свойств глубинных культур на основе штамма СТИ-ПР-4 в АКС и ПС на основе КГРКМ. Статистическая сводка и группировка значений исследуемых показателей роста, результаты которых представлены в таблице 2, позволила оценить влияние питательной основы среды культивирования на выход спор у нативных культур штамма СТИ-ПР-4, выращенных в АКС и ПС на основе КГРКМ. Выход спор у нативных культур на основе штамма СТИ-ПР-4, полученных на питательных средах из КГРКМ и АКС, составил по общей концентрации спор 0,6 и 0,9 млрд. спор·см⁻³, соответственно; по концентрации жизнеспособных спор — 0,5 и 0,4 млрд. спор·см⁻³, соответственно; по доле спор в нативной культуре — 38 и 37%, соответственно; по доле жизнеспособных спор — 69 и 48%, соответственно.

На основании анализа критерия Фишера признано существенным влияние питательной основы на выход спор у нативных культур по показателям общей концентрации спор $OK_{спр}$ и доли живых спор $ДЖ_{спр}$. Для доли спор $D_{спр}$ в культуре и концентрации живых спор ($KOE_{спр}$) влияние питательной основы признано несущественным, так как фактическое значение критерия Фишера для этих показателей меньше табличного ($F_{факт.} < F_{табл.}$). Различия между нативными культурами по показателю общей концентрации $OK_{спр}$, обусловленные влиянием питательной основы среды культивирования на выход спор, оцениваются в 8,9%, а по показателю доли жизнеспособных спор $ДЖ_{спр}$ — 9,4%.

Признано существенным ($F_{факт.} > F_{табл.}$) влияние питательной основы среды культивирования на ростовые свойства глубинной культуры по 7 из 10 осмооптических показателей роста и по 3 из 5 традиционным показателям. Влияние питательной основы на степень различия между глубинными культурами в фазе вегетативного развития оценивается в 20,0% по традиционному показателю, характеризующему время утилизации углевода ($T_{угл0}$); в 23,1% — по показателю продолжительности периода снижения концентрации ионов водорода до минимальных значений ($T_{p_{Hmin}}$); в 20,8% — по показателю критического значения (минимальной величины) параметра pH_{min} культуральной жидкости; в 11,4 и 14,6% — по показателям продолжительности ($T_{ген}$) и числа генераций популяции клеток ($N_{ген}$), соответственно; в 12,9 и 13,3% — по относительной (μ) и абсолютной максимальной скорости (V_{max}) накопления биомассы вегетативных клеток, соответственно. В фазе спорообразования: в 37,5% — по показателю продолжительности периода достижения ООЭ максимальных значений $T_{\Delta E_{max}}$ (время начало процесса формирования спор); в 11,4% — по показателю скорости снижения величины ООЭ культуры $V_{убл}$ (скорость процесса формирования спор); в 13,6% — по показателю минимального уровня ООЭ культуры на момент остановки аппарата ΔE_{min} (эффективность процесса спорообразования) и в 72,9% — по продолжительности культивирования T_{min} .

Анализ результатов оценки осмооптических показателей роста культур штаммов при культивировании в средах с различными питательными основами показал, что глубинные культуры штамма СТИ-ПР-4, выращиваемые на КГРКМ, в фазе вегетативного развития отличались от культур, выращиваемых на АКС, менее продолжительным периодом достижения максимальной величины ООЭ; меньшей длительностью одной генерации популяции клеток и соответственно более высо-

кими абсолютной и относительной скоростями прироста биомассы вегетативных клеток. В фазе образования спор глубинные культуры штамма СТИ-ПР-4, выращиваемые на КГРКМ, характеризовались ранним, по сравнению с культурами, выращиваемыми на АКС, началом и большей скоростью убыли из культуры осмотически активных клеток. Данные о продолжительности генерации и скорости нарастания биомассы вегетативных клеток, а также времени начала и скорости формирования из них спор свидетельствуют о том, что при выращивании в питательных средах на основе КГРКМ глубинные культуры штамма СТИ-ПР-4 демонстрируют более высокие ростовые свойства и лучшее спорообразование, чем при выращивании на АКС.

Результаты оценки ростовых свойств культур штамма СТИ-ПР-4 в разных питательных средах по осмооптическим характеристикам совпадают с аналогичными оценками, полученными с использованием традиционных показателей. При выращивании на АКС время полной утилизации углевода клетками штамма СТИ-ПР-4, период снижения концентрации ионов водорода до минимальных значений и время накопления биомассы были более продолжительными, а pH_{\min} и уровень накопления максимальной величины биомассы принимали более низкие значения, чем в глубинной культуре, выращиваемой в питательной среде на основе КГРКМ.

Однако следует заметить, что выход спор у нативных культур, выращенных в средах на основе КГРКМ, на момент остановки аппарата-культиватора по показателю $DЖ_{\text{спр}}$ был выше, чем в АКС, в 1,4 раза, но ниже в 1,5 раз по показателю $OK_{\text{спр}}$. Более высокий показатель $OK_{\text{спр}}$ нативных культур, выращенных в АКС, при явном преимуществе ростовых свойств глубинных культур, выращиваемых в питательной среде на основе КГРКМ, объясняется в 2,7 раза большей продолжительностью культивирования. В то же время увеличение продолжительности культивирования с 2 до 6 суток, наряду с относительным увеличением общей концентрации спор в культуре в 1,5 раза, привело к снижению в ней доли жизнеспособных спор в 1,4 раза.

Сравнительная оценка ростовых свойств глубинных культур на основе штамма СТИ-ПР-4 в аппаратах-культиваторах разной конструкции и общей вместимости. Статистическая сводка и группировка значений исследуемых показателей роста, результаты которой представлены в таблице 3, позволили оценить влияние конструктивных особенностей аппаратов-культиваторов на выход спор у нативных культур штамма СТИ-ПР-4. Выход спор у нативных культур на основе

штамма СТИ-ПР-4, выращенных в аппаратах-культиваторах общей вместимостью 20 и 100 дм³, по показателю $OK_{\text{спр}}$ составил 1,2 и 0,6 млрд. спор·см⁻³, соответственно; по $KOE_{\text{спр}}$ — 0,7 и 0,4 млрд. спор·см⁻³, соответственно; по доле спор в нативной культуре ($D_{\text{спр}}$) — 68,8 и 31%, соответственно; по $DЖ_{\text{спр}}$ — 66,0 и 58%, соответственно. На основании анализа критерия Фишера влияние типа аппарата-культиватора на выход спор в нативных культурах признано существенным ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{табл.}}$). Конструктивные особенности аппарата-культиватора детерминируют различия между нативными культурами по показателю $OK_{\text{спр}}$ — на 30,8%, по $KOE_{\text{спр}}$ — на 25%, по $D_{\text{спр}}$ — на 42,6% и по $DЖ_{\text{спр}}$ — на 43,7%.

Влияние конструктивных особенностей аппаратов-культиваторов на ростовые свойства глубинной культуры признано несущественным по традиционным показателям и существенным ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{табл.}}$) по 5 из 10 осмооптических показателей. Влияние конструктивных особенностей аппаратов-культиваторов на ростовые свойства глубинных культур в фазе вегетативного развития оценивается в 19,8% по показателю $T_{\text{ген}}$, в 24,9% — по $N_{\text{ген}}$ и в 21,9% — по V_{max} . В фазе спорообразования это влияние оценивается в 29,7% по показателю минимального уровня ООЭ культуры на момент остановки аппарата ΔE_{\min} (эффективности процесса спорообразования) и 19,5% — по продолжительности культивирования T_{\min} .

Глубинные культуры штамма СТИ-ПР-4, выращиваемые в аппаратах-культиваторах общей вместимостью 12 дм³, в фазе вегетативного развития отличал менее продолжительный, чем у культур, выращиваемых в аппарате-культиваторе вместимостью 100 дм³, период одной генерации популяции клеток $T_{\text{ген}}$; более высокая абсолютная максимальная скорость роста глубинной культуры и низкая доля осмотически активных клеток на момент остановки аппаратов.

Снижение ростовых свойств глубинных культур при выращивании в аппарате-культиваторе общей вместимостью 100 дм³ нашло свое выражение в низком выходе спор у нативных культур. Согласно характеристикам процесса развития и спорообразования глубинной культуры, полученным с помощью осмооптических показателей, низкие концентрации спор в нативной культуре штамма СТИ-ПР-4 могут быть обусловлены не только более продолжительным периодом деления клеток, низкой скоростью накопления вегетативной биомассы клеток и малым числом генераций вследствие ранней остановки процесса культивирования, но и низкой способностью вегетативных клеток к спорообразованию в условиях, создаваемых в аппарате-культиваторе общей вместимостью 100 дм³. В

результате на момент остановки аппарата-культиватора (в среднем 52 ч) средняя величина ООЭ глубинной культуры штамма СТИ-ПР-4 составила 35%, тогда как у культуры из аппарата общей вместимостью 20 дм³ этот показатель составлял 1,6%, что свидетельствовало о практически полном отсутствии в культуральной жидкости осмотически активных вегетативных клеток. Полученные данные согласуются с результатами определения полноты спорообразования. Доля спор в нативных культурах, выращенных в аппарате-культиваторе общей вместимостью 100 дм³, в среднем составила 55%, а в нативных культурах, выращенных в аппаратах-культиваторах общей вместимостью 20 дм³, — 68,8%. То есть, в нативных культурах, выращенных в аппарате-культиваторе вместимостью 100 дм³, оставалось до 45% вегетативных клеток.

В дальнейшем с применением метода факторного анализа были исследованы структура и характер многофакторных отношений между традиционными показателями процесса культивирования, осмооптиче-

скими характеристиками развития глубинной культуры и показателями концентрации спор в нативной культуре. Для оценки информативности исследуемых показателей и характеристик использован графический метод. Он дает возможность все многообразие факторов, влияющих на способность популяции клеток к росту и спорообразованию, представить двумя обобщающими факторами (горизонтальной и вертикальной осями координат), а показатели, отражающие процессы роста и формирования спор в развивающейся глубинной культуре, — векторами, проведенными из начала координат в точки с координатами соответствующих факторных нагрузок. Величины нагрузок измеряемых параметров на оси координат показывают степень их зависимости от определяющих факторов. Коэффициенты корреляции между показателями в факторном пространстве равны произведению длин векторов на косинус угла между ними. На рисунке 1 представлено графическое изображение многопараметрического пространства.

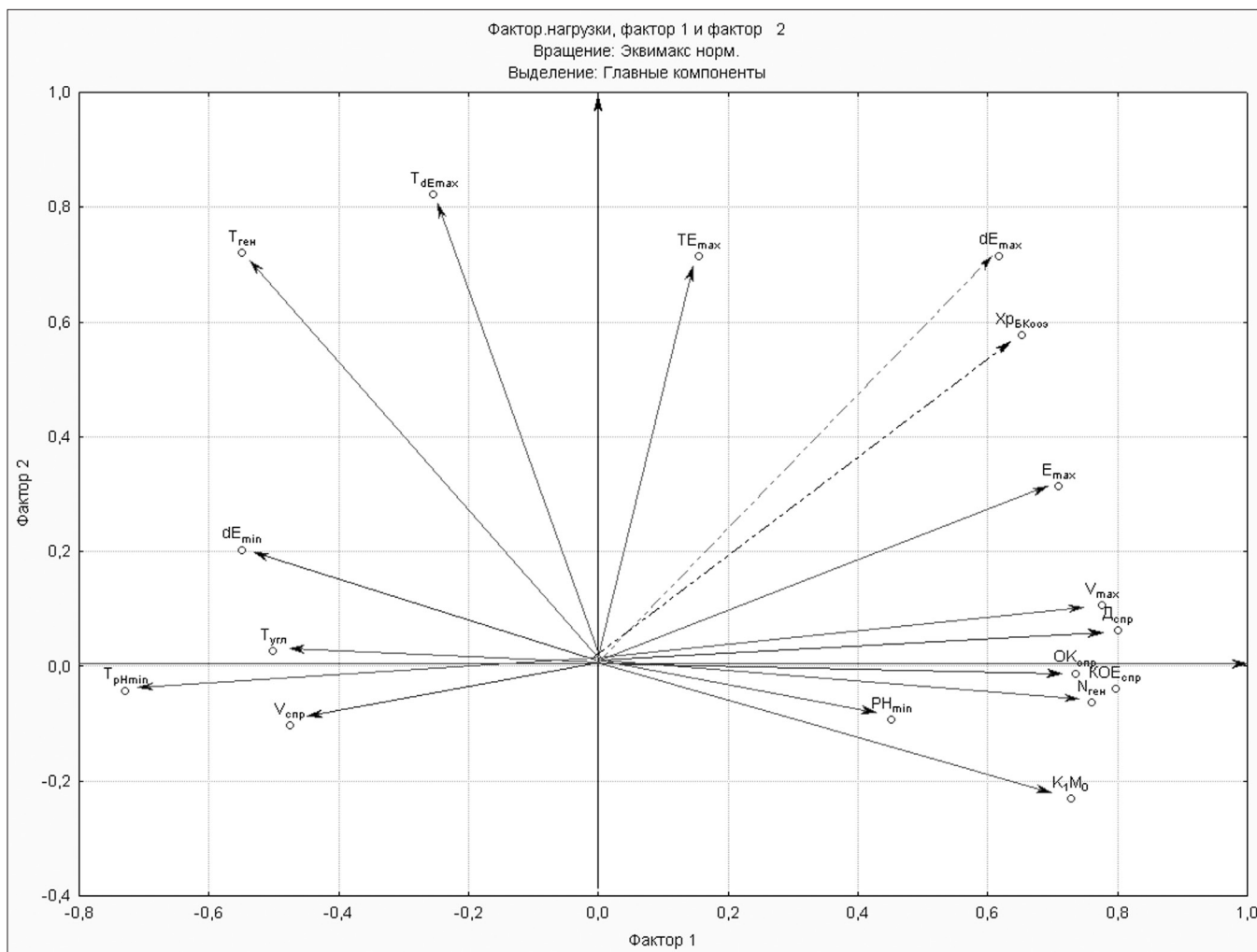


Рис. 1. Графическое изображение пространства показателей роста и спорообразования клеток культуры *B. anthracis*

Результаты анализа свидетельствуют, что не менее 52,2% изменений всех показателей, характеризующих развитие глубинной культуры клеток *B. anthracis*, можно описать двумя обобщающими факторами, которые определяют процесс размножения и накопления популяции вегетативных клеток (обобщающий фактор Ф2) и процесс формирования из вегетативных клеток спор (обобщающий фактор Ф1). На это указывают нагрузки векторов группы показателей на тот или иной обобщающий фактор. Наибольшую нагрузку на фактор Ф1 имеют показатели концентрации спор в нативной споровой культуре ($OK_{спр}$, $D_{спр}$, $KOE_{спр}$ и $DЖ_{спр}$), а на фактор Ф2 — характеристики продолжительности накопления биомассы вегетативных клеток ($T_{\Delta E_{max}}$, $T_{ген}$, $T_{E_{max}}$). Определяющим в формировании выхода спор в нативной культуре является фактор Ф1. На его долю приходится большая, чем на фактор Ф2, часть общей дисперсии (40%). Величины нагрузок показателей на обобщающие факторы представлены в таблице 4.

Из данных таблицы 4 и рисунка 1 видно, что кроме показателей $OK_{спр}$, $D_{спр}$, $KOE_{спр}$ и $DЖ_{спр}$, идентифицирующих влияние фактора Ф1 на процесс образования спор, достаточно большие нагрузки имеют показатели, характеризующие скорость, уровень накопления биомассы вегетативных клеток (μ , V_{max} , $N_{ген}$, $T_{\rho H_{min}}$, E_{max} , $X\rho_{BK_{oo\ddot{e}}}$) и полноту формирования из них спор (ΔE_{min}). Этот факт позволил, используя регрессионный анализ, разработать статистические модели, прогнозирующие выход спор в нативных культурах на основе традиционных показателей процесса культивирования и осмооптических характеристик развития глубинной культуры. Аналитические выражения, описывающие стохастическую модель развития глубинной культуры, представлены уравнениями (1), (2) и (3).

$$OK_{спр} = 0,77 + 0,311 \times \Delta E_{max} - 0,59 \times \mu + 0,614 \times N_{ген} + 0,117 \times T_{урл0} + 0,342 \times E_{max} - 0,001 \times T_{\Delta E_{max}} - 1,4 \times X\rho_{BK_{oo\ddot{e}}} - 0,34 \times V_{\Delta E_{убл}} - 0,06 \times \rho H_{min} + 0,209 \times T_{E_{max}} + 0,57 \times V_{max} + 0,272 \times T_{ген} - 0,52 \times \Delta E_{min} - 0,51 \times T_{\rho H_{min}}. \quad (1)$$

(R=0,798; F=1,000; R²=0,636)

$$KOE_{спр} = 0,309 + 0,765 \times \Delta E_{max} + 0,276 \times \mu + 0,765 \times N_{ген} + 0,125 \times T_{урл0} + 0,276 \times E_{max} - 0,32 \times T_{\Delta E_{max}} - 0,92 \times X\rho_{BK_{oo\ddot{e}}} - 0,29 \times V_{\Delta E_{убл}} - 0,17 \times \rho H_{min} - 0,02 \times T_{E_{max}} - 0,57 \times V_{max} + 0,436 \times T_{ген} - 0,31 \times \Delta E_{min} - 0,41 \times T_{\rho H_{min}}. \quad (2)$$

(R=0,857; F=1,577; R²= 0,734)

$$D_{спр} = - 15,185 - 0,033 \times \Delta E_{max} - 0,86 \times \mu + 0,670 \times N_{ген} + 0,147 \times T_{урл0} + 0,057 \times E_{max} + 0,439 \times T_{\Delta E_{max}} - 1,5 \times X\rho_{BK_{oo\ddot{e}}} - 0,38 \times V_{\Delta E_{убл}} + 0,141 \times \rho H_{min} + 0,213 \times T_{E_{max}} - 1,24 \times V_{max} + 0,173 \times T_{ген} - 0,45 \times \Delta E_{min} - 0,77 \times T_{\rho H_{min}}. \quad (3)$$

(R=0,913; F=2,872; R²=0,834)

О надежности прогностической оценки содержания живых микробов в готовой нативной культуре с использованием представленных функций свидетельствуют высокие коэффициенты множественной корреляции, равные 0,797, 0,857 и 0,913 ($R_T 0,95 = 0,75$), соответственно, а также значимые коэффициенты детерминации, равные 0,636, 0,734 и 0,834, соответственно.

Заключение

Таким образом, исследовано влияние индивидуальных штаммовых характеристик клеток *B. anthracis* и условий их выращивания на ростовые свойства глубинных культур и выход спор в нативных культурах.

Выявлено, что наибольшее влияние на выход спор в нативной культуре по показателям $OK_{спр}$, $KOE_{спр}$ и $D_{спр}$ оказывают два фактора: индивидуальные штаммовые характеристики клеток *B. anthracis* с величиной коэффициента детерминации 43,7, 39,8 и 30,9%, соответственно, и конструктивные особенности аппарата-культиватора с величиной коэффициента детерминации 30,8, 25,0 и 42,6%, соответственно.

Установлено, что из традиционных показателей наиболее информативными (чувствительными к изменению штаммов клеток *B. anthracis* и условий культивирования) являются показатели времени полной утилизации углевода $T_{урл0}$ и времени достижения культурой критических (минимальных) значений $\rho H - T_{\rho H_{min}}$. Данные показатели имели наибольшие коэффициенты детерминации по штаммам (46,6 и 55,1%, соответственно) и питательной среде (23,1 и 20,8%, соответственно).

Наибольшую информативность среди дополнительных показателей продемонстрировали:

- время достижения культурой максимальных $T_{\Delta E_{max}}$ и минимальных значений $T_{\Delta E_{min}}$ ООЭ;
- длительность деления клеток $T_{ген}$ и число генераций $N_{ген}$;
- относительная μ и абсолютная максимальная V_{max} скорости роста;
- скорость снижения ООЭ культуры $V_{\Delta E_{убл}}$ и минимальный его уровень ΔE_{min} .

Таблица 4
Нагрузки традиционных показателей процесса культивирования, осмоплитических характеристик роста популяции клеток и образования спор развивающейся глубинной культуры *B. anthracis* на основе штаммов СТИ-1 и СТИ-ПР-4 на факторы

Нагрузки параметров на факторы																							
Сокращенное обозначение показателей процесса культивирования и характеристик роста и спорообразования глубинной культуры																							
Обозначение обобщающего фактора, определяющего процесс...	ΔE_{\max}	0,62	0,71	0,83	0,10	-0,23	0,58	0,72	-0,06	-0,10	0,20	0,03	-0,10	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16
	$T_{\Delta E_{\max}}$	-0,25	0,78	0,73	0,65	-0,55	0,76	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16			
	V_{\max}	0,78	0,73	0,65	-0,55	0,76	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16				
	$\mu (KM^0)$	0,73	0,65	-0,55	0,76	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16					
	$X_p^{КОФ_{003}}$	0,65	-0,55	0,76	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16						
	$T_{ген}$	-0,55	0,76	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16							
	$N_{ген}$	0,76	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16								
	$V_{сп}$	-0,47	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16									
	ΔE_{\min}	-0,55	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16										
	$T_{урл}$	-0,50	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16											
	pH_{\min}	0,45	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16												
	$T_{rH_{\min}}$	-0,73	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16													
	E_{\max}	0,71	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16														
	$T_{E_{\max}}$	0,15	0,74	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16															
	$КОФ_{сп}$	0,80	-0,04	0,06	2,78	0,16																	
	$L_{сп}$	0,80	6,75	0,40																			
	$\Delta_{\text{общая дисперсия}}$	6,75	0,40																				
$\Delta_{\text{в общей дисперсии}}$	0,40																						
ИТОГО:		0,56																					

Исследована структура и характер многофакторных отношений между традиционными показателями процесса культивирования, осмооптическими характеристиками развития глубинной культуры и показателями концентрации спор в нативной культуре.

Разработаны математические модели, позволяющие прогнозировать выход спор в нативной культуре по показателям роста глубинной культуры клеток. Полученные модели обладают высокой надежностью и диагностической эффективностью, что дает возможность использовать их для контроля и управления процессами приготовления нативных споровых культур вакцинных штаммов *B. anthracis*.

Литература

1. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул. — М.: Высшая школа, 1982. — 223 с.
2. Пат. 2037805 Российская Федерация. Способ определения содержания живых микробов в биопрепарате/

Швецов С.А.; заявитель и патентообладатель НИЦ ФБУ «33 ЦНИИИ Минобороны России». № 5066427/13: заявл. 28.08.92; опубл. 19.06.95.

3. Разработка способа получения эталонного сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 и нормативно-технической документации по его поддержанию и контролю качества: отчет о НИР / 48 ЦНИИИ Минобороны России; рук. Кожухов В.В., Климов В.И.; ис-полн. Сурков С.В. [и др.]. — Тема № 0-93-23У-К, 1994. — Арх. 48 ЦНИИИ Минобороны России. — Инв. № 30129.
4. Фихман Б.А. Микробиологическая рефрактометрия. — М.: Медицина, 1967. — 280 с.

Список сокращений:

КГРКМ — кислотный гидролизат рыбной кормовой муки.

АКС — аммиачно-казеиновая среда.

ООЭ — осмооптический эффект микробной взвеси в результате плазмолиза жизнеспособных клеток.

ПС — питательная среда.

ПМФ — перитонеальные макрофаги

STUDY OF INFORMATIVITY OF CHARACTERISTICS OF GROWTH PROPERTIES OF SUBMERGED CULTURE *B. ANTHRACIS* TO CONTROL AND FORECASTING PROCESS OF SPORULATION

I.V. DARMOV, S.A. SHVETSOV, I.N. SEDELNIKOV, A.N. SHEVTSOV, D.V. BOROVSKOY, K.E. GAVRILOV, A.N. MOSHKOV, V.V. FOKINA, R.Sh. ZIGANSHIN, E.Ju. VAHNOV

Research Centre (military unit 23527)

33 Central Research and Testing Institute of the Defense Department, Kirov

The results of studies of the deep culture of *B. anthracis* vaccine strains based on ST-1 and ST-PR-4 using routine and additional indicators. The data on the structure of multivariate relationships between routine maintenance parameters of the cultivation process, the characteristics of growth, sporogenesis and access dispute in native culture. Shown that the characteristics of growth and properties of spore-forming ability of the deep culture are highly informative and diagnostic efficiency, which allows their use in statistical models to monitor and forecast the concentration of spores in the native cultures of the vaccine strains *B. anthracis*.

Keywords: *B. anthracis*, strains, nutritional basics, developing deep culture, growth properties, parameters of the growth kinetics, characteristics of sporogenesis, native spore culture, indicators output of spores, stochastic model.

НУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В ПОПУЛЯЦИЯХ *POPULUS TREMULA* L. ПЕРМСКОГО КРАЯ

Т.Н. СВЕТЛАКОВА*, С.В. БОРОННИКОВА, И.В. БОБОШИНА

ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь

Изучен нуклеотидный полиморфизм — single nucleotide polymorphisms (SNPs) 14 генов в семи популяциях *Populus tremula* L. Пермского края. Выявлено 56 SNPs, из которых только 8 (14,2%) вели к замене кодируемой аминокислоты. Наибольшая частота SNPs в геноме *P. tremula* была выявлена в интронах (1 SNP на 51 нуклеотид), наименьшая — в экзонах (1 SNP на 217 нуклеотидов). В среднем частота SNPs в геноме *P. tremula* составила 1 SNP на 92 нуклеотида, что больше на 13,0%, чем в геноме *P. trichocarpa*, и на 21,7% больше, чем в геноме *P. nigra*.

Ключевые слова: нуклеотидный полиморфизм, SNP, *Populus tremula*.

Введение

Практический интерес к нуклеотидному полиморфизму сильно возрос в ходе реализации проектов по определению полных нуклеотидных последовательностей ряда модельных организмов. SNP — это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в некоторой популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели), причем редкий аллель встречается с частотой не менее 1% [1]. В самом определении SNPs заложена ориентация на их использование в качестве генетических маркеров (ограничение по частоте встречаемости противопоставляет их редким мутациям) [2]. SNPs имеют очень низкий уровень мутаций на поколение ($\approx 10^{-8}$), что делает их удобными маркерами молекулярной эволюции [3, 4].

Благодаря относительно небольшому размеру генома и огромным адаптивным возможностям род *Populus* стал модельным для генетических исследований древесных растений [5]. Североамериканский вид тополя *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray (западный бальзамический тополь, или калифорнийский тополь) был первым древесным видом растений, геном которого был полно-

стью секвенирован в 2006 году [6]. *Populus tremula* L. — характерный для России вид тополя. Скорость роста, свойства древесины и форма дерева делают его хорошим кандидатом для использования в целлюлозно-бумажной промышленности. Генетические исследования природных популяций необходимы для начала генетических программ отбора деревьев для плантационного выращивания [7, 8, 9].

Цель нашего исследования — определение нуклеотидного разнообразия семи популяций *P. tremula* L. в Пермском крае. Для достижения цели были проанализированы 14 генов *P. tremula*, выявлены SNPs в секвенированных последовательностях ДНК, определено расположение SNPs в разных областях структурных генов, проведено сравнение частот SNPs у трех видов рода *Populus*.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования избраны популяции вида тополь дрожащий, или осина (*P. tremula* L.). С 2007 по 2012 годы были проведены комплексные исследования 7 природных популяций *P. tremula*, которые располагаются в разных участковых лесничествах Пермского края (рис. 1). Выделение ДНК проводили по методике С. Роджерса с соавторами [11]. Концентрацию и спектральную характеристику ДНК определяли на приборе Spectrofotometer™ NanoDrop 2000 («Thermo scientific», USA). Амплификацию проводили в термоциклере Gene Amp PCR System 9700 («Applied Biosystems», USA) по стандартной программе. Детекцию продуктов амплификации проводили электрофорезом в 2% агарозном геле в 1× TBE буфере, окрашивали

© 2012 г., Светлакова Т.Н., Боронникова С.В.,
Бобошина И.В.

* **Автор для переписки:**

Светлакова Татьяна Николаевна
аспирант, научный сотрудник ЕНИ
ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный
исследовательский университет»
614990 Пермь, Пермский край, ул. Букирева, 15
Тел.: +7 (342) 2-396-729
E-mail: atea2@yandex.ru

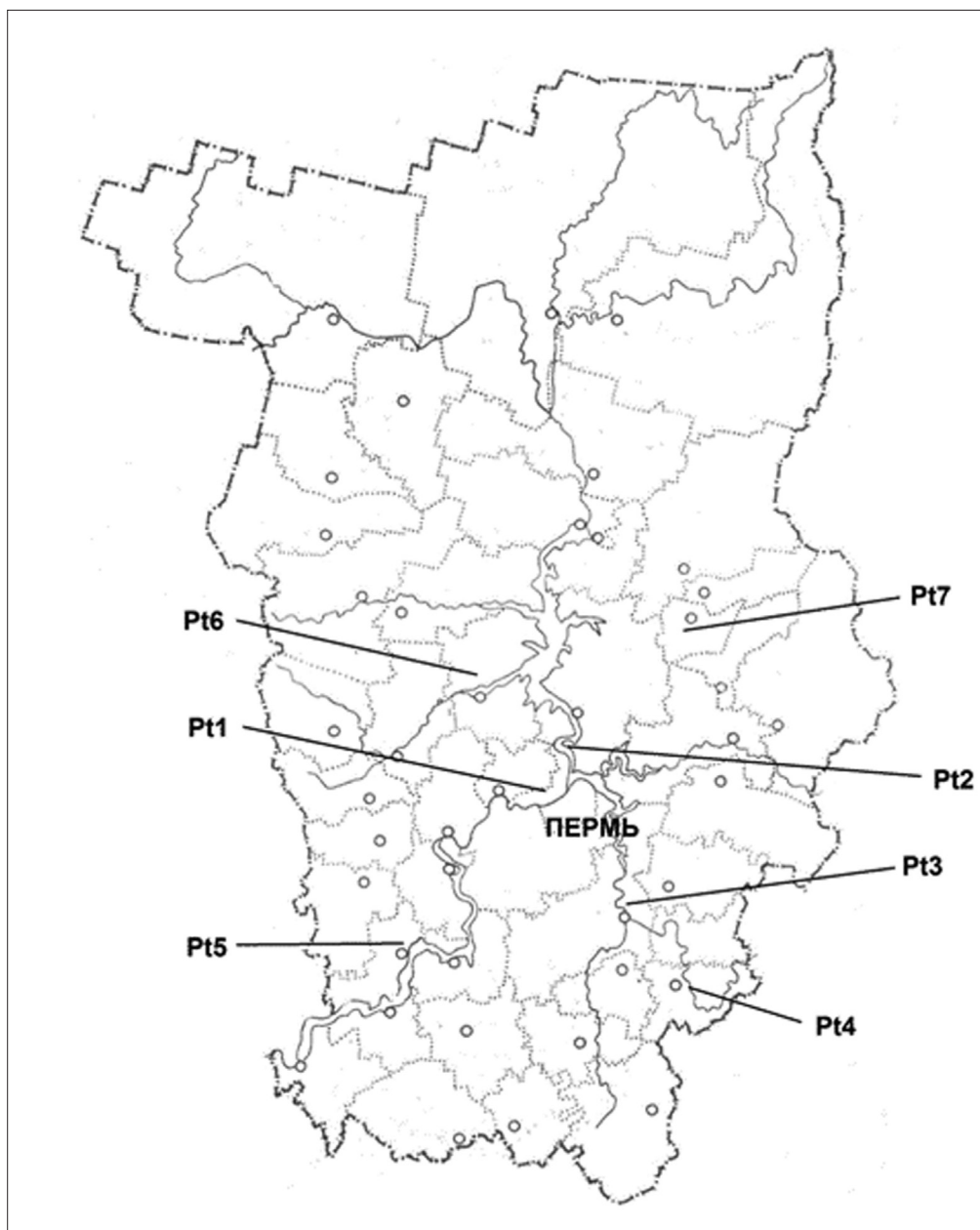


Рис 1. Изученные популяции *P. tremula* в Пермском крае: Pt1 (Пермский район), Pt2 (Добрянский район), Pt3 (Кунгурский район), Pt4 (Суксунский район), Pt5 (Частинский район), Pt6 (Губахинский район), Pt7 (Ильинский район)

бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации Gel Doc XR («Bio-Rad», USA). Для реакции секвенирования был использован Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», USA), в качестве праймера была использована реверсная последовательность из пары праймеров, с которой была поставлена ПЦР. Очистку продуктов реакции секвенирования от невступивших в реакцию меченых нуклеотидов осуществляли с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit («Applied Biosystems», USA). Секве-

нирование синтезированных последовательностей проводили в ПЦР лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета – ПГНИУ (Россия) в 24-капиллярном генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500xL («Applied Biosystems», USA).

Дизайн праймеров проведен в программе Primer 3 на основе генома *P. trichocarpa* в Институте растительной геномики (Франция) [8]. С использованием стратегии для изучения нуклеотидного разнообразия видов рода *Populus* [8] проведен ПЦР-анализ 36 пар праймеров к

27 генам кандидатам. Установлено, что эффективными для *P. tremula* являются 14 пар праймеров. Исследуемые 14 генов относятся к 4 функциональным группам: формирование клеточной стенки и клеточная дифференциация (PopLTP1, PopFLA, PtrCOBL4, PopСНТ), устойчивость к водному стрессу и дегидратации (Erecta, PopDhn1), биосинтез лигнина (Ptr4CL, CAMb, F5H1, C4H3, GH3-5), устойчивость к патогенам (PIN-T, TR-INH2, PatRelProt, OX-RED, RIB-PROT). Секвенированные последовательности ДНК были сравнены с имеющимися последовательностями в генетических базах данных посредством системы автоматического on-line выравнивания BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Множественное выравнивание последовательностей проводилось в MultAlin [10].

Результаты и обсуждение

По результатам наших исследований выявлено 56 SNPs. Проведен анализ характера нуклеотидного полиморфизма на предмет замены кодируемой аминокислоты (табл. 1). Из обнаруженных полиморфных нуклеотидных

позиций 8 приводили к замене кодируемой аминокислоты (рис. 2).

При сравнении нуклеотидного полиморфизма с аналогичными показателями двух других видов рода *Populus* у *P. tremula* на территории Пермского края выявлен более высокий уровень нуклеотидной изменчивости – 1 SNP на 92 нуклеотида (табл. 2). Установлено, что наиболее изменчивыми в популяциях *P. tremula* L. Пермского края являются гены устойчивости к патогенам (1,62 SNPs на 100 позиций нуклеотидов), а консервативными – гены формирования клеточной стенки и клеточной дифференциации (0,75 SNPs на 100 позиций нуклеотидов). В геноме *P. tremula* наибольшая частота SNPs выявлена в интронах (1 SNP на 51 нуклеотид), а наименьшая – в экзонах (1 SNP на 217 нуклеотидов).

Из 56 выявленных SNPs только 8 (14,2%) вели к замене кодируемой аминокислоты. Для видов *P. nigra* и *P. trichocarpa* процент несинонимичных замен равен 23% [8]. В среднем частота SNPs в геноме *P. tremula* составила 1 SNP на 92 нуклеотида, что больше на 13,0% чем в геноме *P. Trichocarpa*, и на 21,7% больше, чем в геноме *P. nigra*.

Таблица 1

SNPs в последовательностях 5 генов *P. tremula*

Локус	Длина локуса, пн	Всего SNPs	Количество замен синонимов	Количество замен несинонимов
C4H1	322	1	1	0
Ptr4CL	665	6	5	1
CAMb	379	4	3	1
F5H1	650	10	10	0
GH3-5	646	8	6	2
Всего:		29	25	4

Примечание: C4H1 – trans-cinnamate 4-monoxygenase; Ptr4CL – 4-Coumarate: CoA ligase; CAMb – trans-caffeoyl-CoA 3-о-methyltransferase; F5H1 – flavonoid 3'-hydroxylase; GH3-5 – GH3 family protein

Таблица 2

Сравнение частот SNPs в разных областях генома у трех видов рода *Populus*

Вид тополя	Частота SNP			
	Общая	UTR регион	Экзон	Инtron
<i>P. nigra</i>	1/112	1/78	1/201	1/46
<i>P. trichocarpa</i>	1/104	1/75	1/143	1/68
<i>P. tremula</i>	1/92	1/77	1/217	1/51

Примечание: частоты SNPs у видов *P. nigra* и *P. trichocarpa*. Источник: [8]

	2320	2330	2340	2680	2690	2700
1	CTTTCAA	ACTTTAATA	ACCAATGAAGTA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTAAGAAGT	AATAAGA
2	TTTTCAA	ACTCTAA---	CCAGTGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTAAGAAGT	AATAAGA
3	CTTCCAAC	ACTCAC---	CCAGTGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTAAGAAGT	AATAAGA
4	CTTCCAAC	ACTCAC---	CCAATGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTAAGAAGT	AATAAGA
5	TAATCCACA	ATCAA---	ACTGTGAAGTA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTCAGAAA	ACATAAGA
6	TAATCCACA	ATCAA---	ACTGTGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTTAGAAGC	ATAAGA
7	TAATCAAC	AGTCTA---	ACAATGAATCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTGAGAAA	ACATAAGA
8	TATCAATG	CTGGAG---	ATGAGACCCCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTGAGAAAGC	ATAAGA
9	TAATCCACA	ATCAA---	ACTGTGAAGTA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTCAGAAA	ACATAAGA
10	TAATCAAC	AGTCTA---	ACAATGAATCA	AATGCAGCAGAGGAGAAT	GTGAGAAA	ACATAAGA
		A			B	C

Рис. 2. SNPs, выявленные при множественном выравнивании секвенированных последовательностей гена САМб. Примечание: А – вставка триплета, кодирующего стоп-кодон; В – синонимичная замена нуклеотида, кодоны GTA, GTC, GTT кодируют одну аминокислоту валин (Val); С – несинонимичные замены: триплеты AGT и AGC кодируют аминокислоту серин (Ser), триплет AAC – аспарагин (Asn). Обозначения: 1 – *Populus tremula*; 2 – *Medicago truncatula*; 3 – *Glycine max* LOC100775206 (LOC100775206), mRNA; 4 – *Glycine max* protein LOC100806354 (LOC100806354), mRNA; 5 – *Populus trichocarpa*; 6 – *Populus trichocarpa* clone POP021-E24; 7 – *Vitis vinifera* LOC100266348 (LOC100266348), mRNA; 8 – *Populus trichocarpa*, mRNA; 9 – *Vitis vinifera*; 10 – *Arabidopsis lyrata subsp. lyrata* hypothetical protein, mRNA

Заключение

Нашими результатами подтверждены данные [8, 12] о том, что *P. tremula* характеризуется большим нуклеотидным полиморфизмом по сравнению с другими представителями рода *Populus*. Обнаруженные SNP-маркеры в нуклеотидных последовательностях генов, контролирующих фенотипические вариации, имеют высокую разрешающую способность при оценке родства как видов растений, так и отдельных деревьев. На основе выявленных SNPs возможно проведение молекулярной идентификации и паспортизации природных популяций *P. tremula*.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития ПГНИУ «Рациональное природопользование: технологии прогнозирования и управления природными и социально-экономическими системами» (2010–2019 г.), при выполнении государственного задания на оказание услуг, финансируемых Министерством образования и науки РФ из средств федерального бюджета, а также в рамках международного договора о сотрудничестве ПГНИУ и Университета Evry Val d'Essonne (France).

Литература

1. Бородина Т. Методы детекции SNP [Электронный ресурс]. Практическая Молекулярная Биология. URL: http://molbiol.edu.ru/review/04_03b.html (дата обращения: 22.05.2012).
2. Светлакова Т.Н., Бобошина И.В., Нечаева Ю.С. и др. Генетическая дифференциация популяций *Populus tremula* L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров // Аграрный вестник Урала, – 2012 март. – Вып. 3(95). – С. 11–13.
3. Brookes A.J. The essence of SNP // Gene. – 1999. – N 234. – P. 177–186.
4. Brunner A.M., Busov V.B., Strauss S.H. Popular genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species // Trends in Plant Science. – 2004. – Vol. 9. – N 1. – P. 49–56.
5. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // Nucl. Acids Res. – 1988. – N 16 (22). – P. 10881–10890.
6. Crow J.F. Spontaneous mutation as a risk factor // Exp. Clin. Immunogenet. – 1995. – N 12. – P. 121–128.
7. Geburek T., Turok J. Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe. – Arbora Publishers, 2005. – 694 p.

8. Ingvarsson P.K. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within an among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae) // *Genetics*. – 2005. – N 169. – P. 945–953.
9. Li W.H., Ellsworth D.L., Krushkal J. et al. Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 1996. – N 5. – P. 182–187.
10. Paolucci I., Faivre Rampant P., Bresson M. A. et al. SNP detection in *Populus* species / In: *Plant and Animal Genome XVI Conference*, January 12–16, 2008.
11. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biology*. – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.
12. Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray) // *Science*. – 2006. – N 313. – P. 1596–1604.

Список сокращений:

SNP – Single nucleotide polymorphism,

TBE – Tris/Borate/EDTA.

NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN POPULATIONS OF *POPULUS TREMULA* L. PERM REGION

T.N. SVETLAKOVA, S.V. BORONNIKOVA, I.V. BOBOSHINA

Perm State National Research University, Perm

Studied nucleotide polymorphism – single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 14 genes seven populations *Populus tremula* L. Perm region. Identified 56 SNPs, of which only 8 (14.2%) led to the replacement of the encoded amino acid. The highest frequency of SNPs in the genome of *P. tremula* was found in the introns (1 SNPs on 51 nucleotide), the lowest – in the exons (1 SNPs on 217 nucleotides). The average frequency of SNPs in the genome of *P. tremula* SNPs was 1 to 92 nucleotides, which is by 13.0% more than in the genome of *P. trichocarpa*, and by 21.7% more than in the genome of *P. nigra*.

Keywords: nucleotide polymorphism, SNP, *Populus tremula*.

ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИКРЫ ЛЕТУЧИХ РЫБ ИЗ СУШЕНОГО СЫРЬЯ

Е.А. АХМЕРОВА*, Л.Р. КОПЫЛЕНКО

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»,
Москва

С нарастающей популярностью блюд восточной кухни во всем мире становится актуальной разработка рациональных режимов производства компонентов этих блюд, в частности, икры летучих рыб. В данной статье представлены результаты исследования качества и безопасности нового объекта — сушеной икры летучих рыб, а также обоснование технологии изготовления готового продукта из нее.

Ключевые слова: икра летучих рыб сушеная, показатели безопасности, химический состав, технология.

Введение

Восточная кухня, в частности, японская, получила широкое распространение во всем мире. В связи с этим за последние годы значительно увеличился импорт икры летучих рыб в Россию, которая используется при приготовлении суши — традиционного японского блюда [4, 6].

Икру летучих рыб заготавливают в экваториальных и субэкваториальных водах Мирового океана, собирая ее в выметанном виде со специальных ловушек, транспортируемых к месту нерестилища [5].

В Россию икру летучих рыб импортируют в основном из Китая, Индонезии, Японии, Перу в сушеном, солено-сушеном, значительно реже мороженом или солено-мороженом виде. При этом содержание поваренной соли в икре может колебаться от 10 до 20%. Для России сушеная икра рыб — новый вид икорного сырья, техническая документация на переработку которого до настоящего времени отсутствовала.

Сушеная, солено-сушеная, мороженая и солено-мороженая икра является полуфабрикатом, подлежащим соответствующей обработке, окраске, смешиванию со вкусо-ароматическими добавками для придания внешнего вида, консистенции, вкуса, свойственного готовому продукту. В данной работе мы рассматриваем технологию изготовления из сушеного сырья икры летучих рыб, используемой для приготовления суши и роллов.

Целью данного исследования являлась разработка рациональных режимов восстановления сушеной икры летучих рыб, обеспечивающих качество и безопасность готовой продукции.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований использовали образцы сушеной икры летучих рыб (сырье) рода *Cheilorogon* из Китая, Индонезии, Японии.

Для определения показателей безопасности использовали следующие методы: КМАФАнМ определяли по ГОСТ 10444.15-94, БГКП (колиформы) — по ГОСТ Р 50474-93, *Proteus* — по ГОСТ 28560-90, *Staphylococcus aureus* — по ГОСТ 10444.2-94, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллу — по ГОСТ Р 50480-93, сульфит-редуцирующие клостридии — по ГОСТ Р 29185-91, *Listeria monocytogenes* — по ГОСТ 51921-02, плесени, дрожжи — по ГОСТ 10444.12-88.

Пробоподготовку для определения токсичных элементов проводили по ГОСТ 26929-94, содержание кадмия, мышьяка и свинца анализировали на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Shimadzu AA-6701» по ГОСТ 30178-96, ГОСТ 26930-86, ГОСТ 26927-86; содержание ртути определяли на ртутном анализаторе Nis фирмы «Nippon Corporation».

Пестициды определяли по МУ под ред. М.А. Клисенко, 1992 г., полихлорированные бифенилы — по МУК 4.1.1023-01 на газовом хроматографе «Mega Series HRGC 5300» фирмы «Carlo Erba».

Массовую долю белка определяли по методу Кьельдаля на автоанализаторе «Kjeltec-1003» фирмы

© 2012 г. Ахмерова Е.А., Копыленко Л.Р.

* Автор для переписки:

Ахмерова Елена

ФГУП «ВНИРО»

170140 Москва, ул. В. Красносельская, 17

E-mail: akhmerovaelena@mail.ru

«Тесатор». Массовую долю жира, воды, поваренной соли — по ГОСТ 7635-75. Размеры икринок определяли с помощью микроскопа марки МБС-10.

Жирные кислоты в виде метиловых эфиров (МЭЖК) анализировали на газовом хроматографе GC-16А фирмы «Shimadzu».

Результаты и обсуждение

Содержание токсичных элементов, хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов во всех исследуемых образцах икры летучих рыб сушеной не превышало нормируемых значений (табл. 1).

Таблица 1

Содержание нормируемых токсикантов в икре летучих рыб сушеной

Показатели	Допустимые уровни, мг/кг, не более	Фактическое значение, мг/кг
Токсичные элементы		
Свинец	1,0	0,005–0,007
Мышьяк	1,0	0,002–0,006
Кадмий	1,0	0,003–0,007
Пестициды		
ГХЦГ и изомеры	0,2	0,002–0,006
ДДТ и метаболиты	2,0	0,003–0,008

В образцах солено-сушеной икры (8% поваренной соли) общее микробное число не превышало нормируемого значения 1×10^4 КОЕ/г. В то же время значение этого показателя в образцах сушеной икры летучих рыб колебалось от $1,7 \times 10^4$ до $1,2 \times 10^7$ КОЕ/г; кроме того, были обнаружены бактерии группы кишечной палочки — БГКП (колиформы). Нормируемые бактерии рода *Proteus*, *S. aureus*, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, сульфит-редуцирующие клостридии, *L. monocytogenes*, плесени и дрожжи отсутствовали.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные образцы сушеной икры не соответствовали Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) по микробиологическим показателям — превышению общего микробного числа и наличию бактерий группы кишечных палочек. В то же время солено-сушеная икра соответствовала требованиям нормативной документации, что, очевидно, связано с действием поваренной соли.

Содержание белка в образцах сушеной икры составляло 51–55%, минеральных веществ — от 8 до 10%, жира — 4–6%, содержание воды колебалось от 8 до 21% (табл. 2). В образцах солено-сушеной икры содержание белка и жира составляло 51–53 и 4–5%, соответственно, содержание воды варьировало от 11 до 20%, минеральных веществ — от 18 до 22% [3].

Таблица 2

Химический состав сушеной и солено-сушеной икры летучих рыб, %

Образцы икры летучих рыб	Содержание, %			
	Белок	Жир	Вода	Минеральные вещества
Сушеная	54–55	5–6	8–21	8–10
Солено-сушеная	51–53	4–5	11–20	18–22

Для обеззараживания икры — снижения общей микробной обсемененности и освобождения от бактерий группы кишечных палочек — ее промывали в воде и водных растворах поваренной соли разных концентраций (0,9; 2,0; 3,0%). Результаты, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о том, что 5-кратное промывание образцов сушеной икры (с исходным микробным числом $1,2 \times 10^7$ КОЕ/г) 3,0%-ным раствором поваренной соли в течение 10 минут при перемешивании обеспечивает соответствие промытой икры санитарным требованиям на сырье: КМАФАМН, КОЕ/г — 3×10^2 , а также отсутствие бактерий группы кишечных палочек.

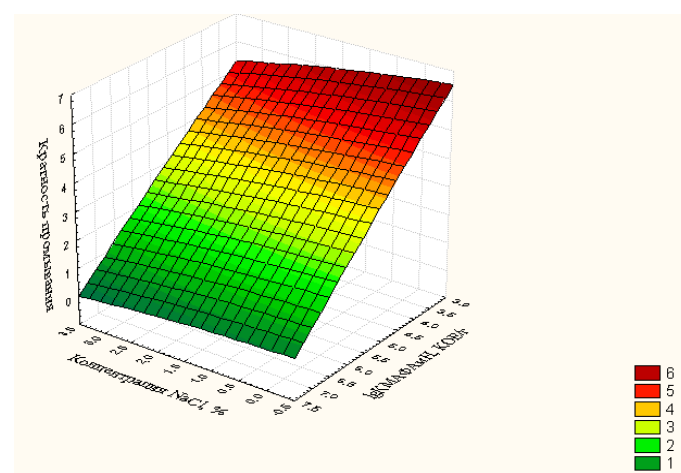


Рис. 1. Влияние концентрации поваренной соли и кратности промывания на общую микробную обсемененность икры летучих рыб

Учитывая, что при промывании икры могут происходить потери белковых веществ, нами было определено

их содержание после промывания икры. Содержание белка в исследуемых образцах перед промыванием колебалось от 12,6 до 12,8%, небелкового азота от 0,009 до 0,013%. Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание небелкового азота в образцах икры, промытых водой или растворами поваренной соли, составляет менее 0,015%. При промывании икры водой и растворами поваренной соли содержание белка снижалось. При 5-кратном промывании сушеной икры водой потери белка составили 1,87%, при повышении концентрации поваренной соли при промывании: 0,9 – 2,0 – 3,0% наблюдалось увеличение потерь белка на 1,80 – 2,04 – 2,36%, соответственно (табл. 3).

Таблица 3

Содержание белковых веществ в образцах икры после промывания водой, %

Кратность промывок	Содержание белка, %			
	Раствор для промывания икры			
	Вода	Поваренная соль, %		
0,9%		2,0%	3,0%	
1	12,81	12,78	12,72	12,70
2	12,71	12,70	12,69	12,67
3	12,68	12,68	12,65	12,62
4	12,65	12,64	12,58	12,56
5	12,57	12,55	12,46	12,40

По результатам проведенных опытов рациональными условиями, обеспечивающими меньшие потери белка и меньшие значения КМАФАМН, КОЕ/г, на 3 порядка ниже нормируемого значения, были следующими: гидромодуль икра: раствор 1:5, время – 10 мин., кратность промывания – 5.

При использовании для восстановления сушеной икры раствора поваренной соли с концентрациями 0,9, 2,0, 3,0% масса икры за счет увеличения воды возрастала в 4,2, 4,0, 3,8 раза, соответственно (рис. 2).

Как видно из рисунка 2, в первые 4 часа восстановления массовая доля воды в икре начинает возрастать с 20 до 60%. Спустя 4 часа наблюдается постепенное и равномерное увеличение массовой доли воды в икре, достигая после 8 часов значений 76–78 и 80% для растворов с концентрацией поваренной соли 3,0–2,0 и 0,9%, соответственно. В последующие часы массовая доля воды остается на достигнутом уровне.

Результаты измерений диаметра икринок после восстановления показали, что наибольшее значение для икры, восстановленной в 0,9%-ном растворе поваренной

соли, составляет 1,2–1,5 мм. Диаметр икринок, восстановленных в 2,0 и 3,0%-ных растворах поваренной соли, составил соответственно: 1,1–1,3 и 1,1–1,3 мм.

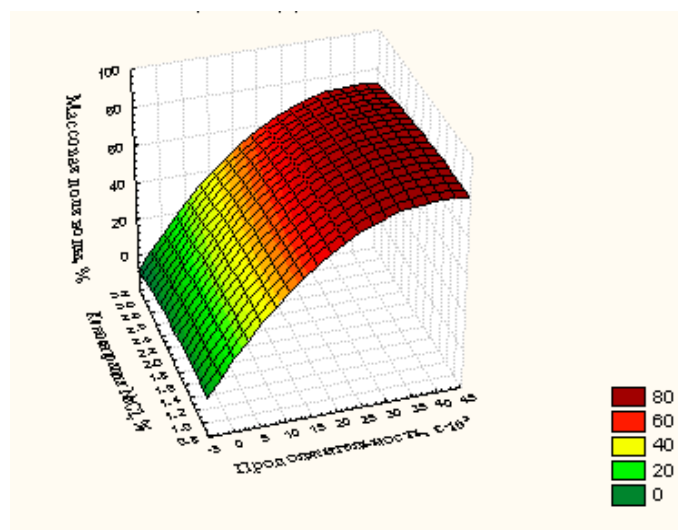


Рис. 2. Увеличение массовой доли воды в зависимости от времени восстановления сушеной икры

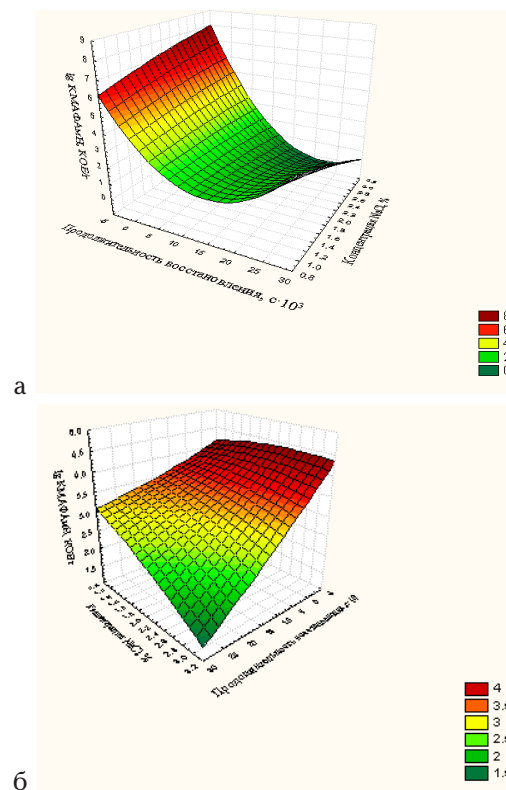


Рис. 3. Влияние концентрации поваренной соли и продолжительности восстановления на общую микробную обсемененность при температуре плюс 15 °С (а) и при плюс 4 °С (б)

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшую массовую долю воды и наибольшие размеры икринок обеспечивает режим восстановления промытой

икры летучих рыб в 0,9%-ном растворе поваренной соли в течение 8 часов.

В результате проведенных исследований выявлена зависимость микробиологических показателей от температуры, степени солености растворов (0,9; 2,0; 3,0%) для восстановления икры при продолжительности 8 часов (рис. 3).

Массовая доля белка в образцах икры летучих рыб восстановленной составила $12,0 \pm 2,0\%$, жира — $2,0 \pm 0,2\%$, минеральных веществ — $7,0 \pm 2,0\%$ и воды — $78,0 \pm 2,0\%$.

Анализ данных, полученных нами по аминокислотному составу белков икры рыб, показывает, что белки восстановленной икры летучих рыб представлены полным набором незаменимых и заменимых аминокислот (табл. 4). В белках икры обнаружено высокое содержание валина — до $6,65$ г/100 г белка, сопоставимое со значением этого показателя в белках икры трески ($6,34$) и наваги ($6,14$). Следует отметить, что самое высокое содержание валина найдено в белках икры лососевых рыб — нерки — $7,65$, горбуши — $7,14$ и кижуча — $7,02$ г / 100 г белка [1, 2].

Таблица 4

Аминокислотный состав белков икры летучих рыб восстановленной, г/100 г белка

Аминокислота	Шкала ФО/ВОЗ	Икра летучих рыб
Валин	3,5	6,60-6,65
Изолейцин	2,8	5,00–5,11
Лейцин	6,6	8,52–8,44
Лизин	5,8	6,94–7,18
Метионин + цистин	2,5	2,73–2,85
Треонин	3,4	4,65–4,73
Фенилаланин + тирозин	6,3	6,44–6,75
Триптофан	1,0	1,0–1,1
Аланин	-	$6,79 \pm 6,92$
Аргинин	-	$5,95 \pm 6,14$
Аспарагиновая кислота	-	$8,92 \pm 9,21$
Гистидин	-	$2,44 \pm 2,57$
Глицин	-	$3,28 \pm 3,47$
Глутаминовая кислота	-	$12,91 \pm 13,34$
Пролин	-	$5,51 \pm 5,72$
Серин	-	$5,54 \pm 5,66$
Сумма незаменимых аминокислот	-	$41,88 \pm 42,81$

По содержанию изолейцина, лейцина, лизина, метионина и цистина белки икры летучих рыб сопоставимы

с белками осетровых, лососевых рыб, трески и наваги; в то же время в белках икры летучих рыб содержится меньше, чем в белках других рыб, тирозина и фенилаланина.

Из числа заменимых аминокислот отмечено высокое содержание в г/100 г белка глутаминовой — $12,91$, аспарагиновой — $8,92$ кислот и низкое содержание гистидина — $2,44$, что характерно для белков икры морских и пресноводных рыб; исключение составляют белки сельди и сазана, в которых гистидина содержится $10,30$ и $8,40$ г/100 г белка, соответственно.

В липидах икры летучих рыб идентифицировано более 20 кислот, в таблице 5 приведены основные из них.

Таблица 5

Основной жирнокислотный состав липидов икры летучих рыб, % к сумме

Наименование кислоты	Код кислоты	Икра летучих рыб
Миристиновая	14:0	1,83–2,02
Пентадекановая	15:0	0,95–1,10
Пальмитиновая	16:0	31,03–33,70
Гептадекановая	17:0	1,09–1,57
Стеариновая	18:0	10,04–11,20
Σ насыщенных кислот:		46,03–51,07
Миристоолеиновая	14:1	0,84–1,01
Пальмитолеиновая	16:1	3,87–4,44
Олеиновая	18:1	15,98–17,04
Эйкозаеновая	20:1	1,02–1,33
Σ мононенасыщенных кислот:		21,71–24,53
Гексадекадиеновая	16:2	0,26–0,58
Гексадекатриеновая	16:3	0,24–0,32
Линолевая	18:2	1,02–1,14
Линоленовая	18:3	0,22–0,32
Октадекатетраеновая	18:4	0,22–0,33
Эйкозодиеновая	20:2	0,20–0,33
Арахидоновая	20:4	0,43–0,56
Эйкозапентаеновая	20:5	4,56–5,11
Докозатетраеновая	22:4	0,45–0,56
Докозапентаеновая	22:5	1,49–1,63
Докозагексаеновая	22:6	11,03–13,05
Σ полиненасыщенных кислот:		20,12–24,40

Липиды икры летучих рыб характеризуются высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, сумма которых колеблется от 20,12 до 24,40% от общего количества кислот. В этой группе доминируют кислоты: докозагексаеновая, доля которой варьирует от 11,03 до 13,05%, и эйкозапентаеновая — от 4,56 до 5,11%; сумма эссенциальных кислот — линолевой, линоленовой и арахидоновой — не превышает 2,0% [1, 2].

По показателям безопасности восстановленная икра соответствовала требованиям нормативной документации. По органолептическим показателям икра летучих рыб соответствовала предъявляемым требованиям: внешний вид — икра разбористая, цвет соответствовал используемому пищевому красителю, запах — приятный без выраженного рыбного, вкус соответствовал используемым вкусо-ароматическим добавкам, консистенция — икринки с прочной оболочкой, при разжевывании хрустели.

Заключение

Таким образом, использованные технологические режимы восстановления сушеной икры летучих рыб позволили получить полуфабрикат, сравнимый по содержанию белка, жира, аминокислотному составу белков и

жирнокислотному составу липидов с икрой морских рыб и превосходящий икру некоторых пресноводных рыб, таких как щука, сазан, кефаль.

Далее полуфабрикат после соответствующей обработки может быть направлен для приготовления суши и роллов.

На основании полученных данных нами была предложена технологическая схема изготовления охлажденной икры летучих рыб из сушеного сырья, которая включает в себя следующие основные этапы: промывание сушеной икры 3%-ным раствором поваренной соли (для икры сушеной без соли) или питьевой водой (для солено-сушеной икры), восстановление, посол с окрашиванием, смешивание с консервантами или пастеризация, фасование, охлаждение (рис. 4).

Процесс промывания проводят питьевой водой с температурой не выше плюс 10 °С, гидромодуль икра — вода 1:5. Затем икру направляют на восстановление в 0,9%-ном растворе поваренной соли, гидромодуль 1:5, в течение 8 часов, после чего икру откидывают на сито, либо на марлю и дают стечь.

Процесс посола проводят совместно с окрашиванием. Для этого подготавливают необходимые ингредиенты (соль, сахар, сорбитол, глутамат натрия, краситель

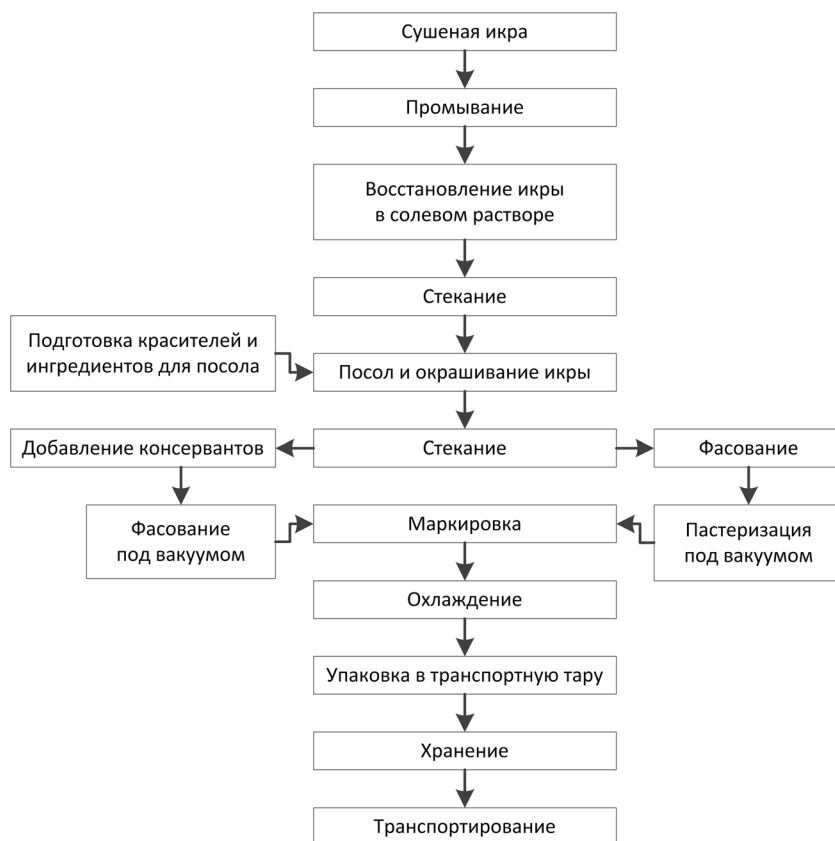


Рис. 4. Схема технологического процесса изготовления икры летучих рыб

пищевой, вода) и смешивают с икрой в соотношении 1:1. Данный процесс занимает 14 часов.

Затем икру снова откидывают на марлю и сначала дают стечь, а затем дополнительно отжимают до содержания воды в готовом продукте 60%, так как икра должна быть разбористой: ее в дальнейшем используют как панировку для роллов.

Для сохранения качества продукта нами было предложено два способа: консервирование смесью бензойнокислого натрия и сорбиновой кислоты в количестве 0,2% к массе продукта или пастеризация икры, упакованной под вакуумом в стеклoбанки или в полимерные барьерные банки prO2tektor.

Разработанные рациональные режимы промывания сушеной икры, ее восстановления, посола, консервирования обеспечивали микробную безопасность готовой продукции и органолептические показатели, свойственные для традиционной икры летучих рыб, в течение 12 месяцев хранения при температуре от минус 2 до минус 4 °С, что подтверждено результатами комплексных микробиологических, физико-химических и органолептических исследований.

На основании проведенных работ разработана техническая документация ТУ и ТИ «Икра летучих рыб зернистая» 9264-114-00472124-2011, утвержденная и согласованная в установленном порядке.

Способ посола сушеной икры летучих рыб защищен патентом — № 2011115759 от 22.04.2011.

Литература

1. Ахмерова Е.А., Копыленко Л.Р. Биологическая ценность икры летучих рыб / Материалы XIII Всероссийского конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Персонифицированная диетология: настоящее и будущее». — М.: Династия, 2011. — С. 9.
2. Ахмерова Е.А., Хамзина А.К. Биологическая ценность липидов икры некоторых видов рыб / VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». — М.: ВНИРО, 2011. — С. 160–161.
3. Akhmerova E., Kopylenko L. Quality and safety of flying fish caviar / Сборник материалов международной школы-семинара «Биологические ресурсы Арктики и Субарктики — потенциал для биотехнологии: исследования и инновации». — Петрозаводск, 2010. — С. 8–9.
4. Bledsoe C.E. Caviars and Fish Roe Products // Food Science and Nutrition. — 2003. — Vol. 43(3). — P. 317–356.
5. Ming-Ho Huang, Ching-Hsiewn Ou. A discussion of management disputes arising from the multiple utilization of flying fish resources in Taiwan and suggested countermeasures // Marine Policy. — 2012. — Vol. 36. — N 2. — P. 512–519
6. Sternin V., Dore I. Caviar. The resource book. — Moscow: Cultura, 1993. — P. 83–85.

MANUFACTURING TECHNOLOGY OF FLYING FISH ROE FROM THE DRIED MATERIAL

E.A. AKHMEROVA, L.R. KOPYLENKO

All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

With the growing popularity of Oriental cuisine in the world is an actual development of rational modes of production of the components of these dishes, in particular, flying fish roe. This article presents the results of a study of quality and safety of a new facility — dried flying fish roe, and the reasons technology manufacturing of the finished product out of it.

Keywords: flying fish roe, dried, safety performance, chemistry, technology.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ 3-ЦИАНОПИРИДИНА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ И СУСПЕНДИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ НИТРИЛ-УТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Ю.Г. МАКСИМОВА^{1*}, Д.М. ВАСИЛЬЕВ², Г.В. ОВЕЧКИНА¹, В.А. ДЕМАКОВ^{1,2}

¹ ФГУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН,

² ГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь

Трансформацию 3-цианопиридина в никотинамид катализировали свободными и адсорбированными на углеродсодержащих носителях клетками *Rhodococcus ruber* gt1 и свободно суспендированными клетками *Pseudomonas fluorescens* C2. Нитрилгидратазная активность родококков, иммобилизованных на карбонизированных углеродных волокнах Урал ТМ-4 при конверсии 200 мМ раствора 3-цианопиридина составила 18 мкмоль/мг/мин. и не возрастала с повышением концентрации субстрата, тогда как активность свободных клеток находилась в линейной зависимости от концентрации субстрата в пределах изученных концентраций (50–800 мМ). Активированные носители не были предпочтительными для иммобилизации клеток в данном биокаталитическом процессе, так как адсорбировали субстрат и продукт реакции. Нитрилазная активность *P. fluorescens* C2 по данному субстрату составила 0,8–0,9 мкмоль/мг/мин. Раствор никотинамида концентрацией 26 г/л был получен за 6 ч при дробном внесении субстрата до концентрации 200 мМ через каждый час, реакцию катализировали 0,6 г/л свободно суспендированных клеток *R. ruber* gt1.

Ключевые слова: 3-цианопиридин, биокаталитическая трансформация, нитрил-утилизирующие бактерии, родококки, псевдомонады.

Введение

Витамины группы РР (никотинамид и никотиновая кислота) являются необходимым элементом питания и признанным официальной медициной лекарственным средством. Обе формы обладают одинаковой биологической активностью и диетологически эквивалентны; при этом никотиновая кислота проявляет более выраженное сосудорасширяющее действие, а никотинамид обладает противовоспалительным и седативным эффектом. Изучается применение никотинамида в комплексном лечении таких заболеваний, как диабет, артрит, псориаз, слабоумие, гиперфосфатемия у пациентов, подвергающихся диализу. Никотинамид — основа коэнзимов дегидрогеназ (НАД⁺, НАДФ⁺); кроме того, он стимулирует

восстановление ДНК после химических и физических повреждений [7].

Никотинамид и никотиновая кислота могут быть получены как химическим, так и биотехнологическим способом. Пиридиновые соединения содержатся в продуктах коксования каменного угля. Главным компонентом β -пиколиновой фракции коксового газа служит β -пиколин, который отгоняют при конденсации в жестких условиях под давлением с формалином и превращают в никотинамид и никотиновую кислоту [5]. Эффективным методом получения никотиновой кислоты является прямое окисление β -пиколина кислородом воздуха на ванадий-титановом катализаторе в температурном диапазоне 250–300 °С; причем селективность реакции достигает 80% [9]. Кроме того, данные соединения могут быть получены окислением 2-метил-5-этилпиридина или гидролизом 3-цианопиридина при высоких температурах (330 °С) и давлении (290 атм.) [6]. Биологический способ получения этих веществ основан на трансформации 3-цианопиридина ферментами метаболизма нитрилов у микроорганизмов. Так, нитрилгидратазно-амидазная ферментативная система осуществляет двустадийный гидролиз этого гетероциклического нитрила до никотинамида и затем до никотиновой кислоты, нитрилазная — одностадийный до нико-

© 2012 г. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М.,

Овечкина Г.В., Демаков В.А.

* Автор для переписки:

Максимова Юлия Геннадьевна

к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН

614081 Пермь, ул. Голева, 13

Тел.: +7 (342) 212-44-76

Факс: +7 (342) 280-92-11

E.mail: maks@iegm.ru

тиновой кислоты. Способность к гидролизу ароматических нитрилов встречается у представителей различных родов бактерий: *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* [1] и грибов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Gibberella*, *Penicillium* [8]. Биотехнологический способ, по сравнению с химическим, протекает при нормальной температуре и давлении, не требует больших энергозатрат, безопасен для окружающей среды и обладает высокой селективностью.

Биокатализ может быть как гомогенным, основанным на процессах, происходящих в однородной среде, так и гетерогенным, происходящим на поверхности раздела фаз. Гомогенным биокатализатором может служить суспензия клеток, чаще клеток микроорганизмов, гетерогенным — клетки, иммобилизованные на нерастворимом носителе.

Целью данной работы являлось изучение гомогенного и гетерогенного процесса биотрансформации 3-цианопиридина в никотинамид и никотиновую кислоту клетками бактерий и разработка свободно суспендированного и иммобилизованного биокатализатора этого процесса.

Материалы и методы

Штаммы *Rhodococcus ruber* gt1 и *Pseudomonas fluorescens* C2 выращивали на синтетической среде N следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 1,6; NaCl — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; pH 7,4 при 30 °С на качалке со скоростью перемешивания 100 об./мин. В качестве источника углерода добавляли глюкозу в концентрации 0,1%, азота — хлорид аммония в концентрации 0,05% для штамма *R. ruber* gt1 и ацетонитрил 0,5% для штамма *P. fluorescens* C2.

Адсорбцию клеток *R. ruber* gt1 на активном угле БАУ (ОАО «Сорбент», Пермь), активированных углеродных волокнах Карбопон-В-актив и карбонизированных углеродных волокнах Урал ТМ-4 (Светлогорское «Химволокно», Беларусь) проводили в калий-фосфатном буфере pH 7,2 при комнатной температуре на качалке со скоростью перемешивания 120 об./мин. в течение 2 ч.

Массу клеток в мл суспензии определяли взвешиванием на аналитических весах предварительно высушенной до постоянного веса биомассы в известном объеме суспензии. Количество адсорбированных клеток определяли по разнице до и после сорбции.

Трансформацию 50–800 мМ растворов 3-цианопиридина проводили в калий-фосфатном буфере при температуре 30 °С на качалке со скоростью перемешивания 90 об./мин. Концентрацию 3-цианопиридина, никотинамида и никотиновой кислоты определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 («Shimadzu», Япония) с колонкой Luna 5u C 18(2) 100A (250×4,6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ KH_2PO_4 и 25% ацетонитрила, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. при температуре 25 °С, детекцию проводили при длине волны 200 нм. Удельную ферментативную активность (ЕД) определяли как количество никотинамида (никотиновой кислоты) в мкмольях, образуемое за 1 мин. биомассой бактерий, соответствующей 1 мг сухих клеток.

Концентрированный раствор никотинамида получали при трансформации 3-цианопиридина, внося субстрат до концентрации 200 мМ в 10 мл реакционной смеси каждый час в течение 6 часов конверсии. Биокатализатором служили свободные и иммобилизованные на носителе Урал ТМ-4 клетки *R. ruber* gt1. Пробы отбирали до внесения очередной порции субстрата, реакцию останавливали концентрированной HCl и определяли концентрацию никотинамида методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение

Проведена трансформация 3-цианопиридина суспендированной биомассой клеток родококков и псевдомонад. Изучены возможность гетерогенного биокатализа 3-цианопиридина и влияние адсорбции клеток родококков на активированных и неактивированных углеродсодержащих носителях на биокаталитический процесс получения никотинамида. Клетки были иммобилизованы на активированных носителях Карбопон-В-актив и БАУ и карбонизированных волокнах Урал ТМ-4. Было показано, что для конверсии ароматического субстрата использование активированного материала в качестве носителя клеток нецелесообразно, поскольку в этом случае адсорбция на нем субстрата и продукта достигает высоких значений. Так, за 1 ч на БАУ из 100 мМ растворов адсорбировалось 90% 3-цианопиридина и около 80% никотинамида, на Карбопон-В-актив — 30 и 3%, соответственно. Как результат, не происходило 100% конверсии субстрата. Более предпочтительным носителем были неактивированные углеродные волокна марки Урал ТМ-4, которые не сорбировали субстрат и продукт. Трансформация 3-цианопиридина иммобилизованными клетками продемонстрирована на рисунке 1.

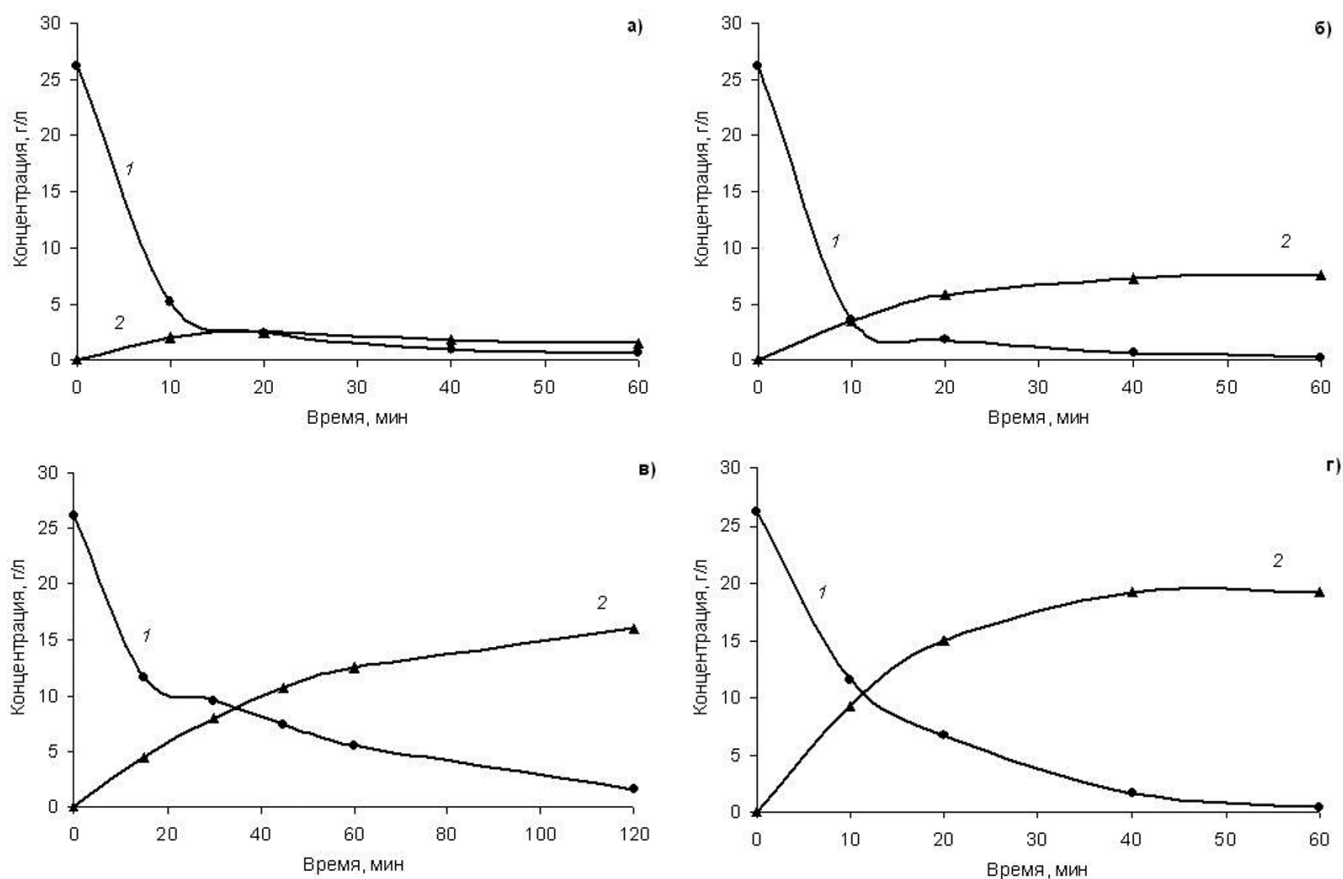


Рис. 1. Трансформация 3-цианопиридина (1) в никотинамид (2) клетками *R. ruber* gt1, адсорбированными на БАУ (а), Карбопон-В-актив (б), Урал ТМ-4 (в) и свободно суспендированными (г)

Изучена зависимость активности нитрилгидратазы свободных и иммобилизованных клеток *R. ruber* gt1 от концентрации субстрата 3-цианопиридина. Найдено, что активность иммобилизованных на нерастворимом носителе (в данном случае, карбонизированных волокнах Урал ТМ-4) клеток при конверсии субстрата, концентрация которого не превышает 200 мМ, близка к активности свободно суспендированных клеток. При дальнейшем повышении концентрации субстрата до 800 мМ у неиммобилизованных клеток наблюдается линейная зависимость активности от концентрации 3-цианопиридина, а у адсорбированных происходит лишь незначительное повышение активности (рис. 2). В отличие от конверсии алифатических нитрилов адсорбированными клетками [3], при трансформации ароматических нитрилов не наблюдалось повышение активности клеток при их иммобилизации.

Конверсию 50, 100 и 200 мМ раствора 3-цианопиридина катализировали суспендированными клетками *R. fluorescens* С2, обладающими нитрилазной активностью. Нитрилазная активность при повышении концентрации

субстрата в исследованном диапазоне незначительно возрастала и составила 0,8 мкмоль/мг/мин. при концентрации 3-цианопиридина 50 мМ и 0,9 мкмоль/мг/мин. — при 100 и 200 мМ.

Пример динамики трансформации 200 мМ раствора 3-цианопиридина дан на рисунке 3. Через 24 ч трансформации 20,8 г/л субстрата 29 мг клеток (по сухой биомассе) продуцировали 14,7 г/л никотиновой кислоты, хотя 3-цианопиридин в среде оставался лишь в следовых количествах (0,005 г/л). За то же время конверсия 50 и 100 мМ растворов субстрата протекала полностью с образованием эквимолярного количества никотиновой кислоты.

Концентрированный раствор никотинамида был получен при конверсии 3-цианопиридина биокатализатором на основе свободных и иммобилизованных на углеродных волокнах Урал ТМ-4 клеток *R. ruber* gt1. Определено, что при внесении каждый час в среду 3-цианопиридина до конечной концентрации 200 мМ в течение 6 часов конверсия свободно суспендированным биокатализатором в количестве 0,6 г/л позволяет

получить раствор никотинамида концентрацией 26 г/л, иммобилизованным в количестве 500 г/л (общая масса носителя) — не более 10 г/л (рис. 4). Интересно, что по истечении каждого часа конверсии свободными клетками субстрат в среде не обнаруживался, но и концентрация продукта эквимолярно не возрастала.

Вероятно, это связано с накоплением продукта в клетках, что объясняется прекращением пассивного транспорта никотинамида из клеток в реакционную среду при возрастании его концентрации вне клеток. Действительно, при разрушении клеток ультразвуком в цитоплазме находили никотинамид и 3-цианопиридин. При конверсии иммобилизованными клетками после 6 ч конверсии в реакционной среде оставался 3-цианопиридин в концентрации 27 г/л.

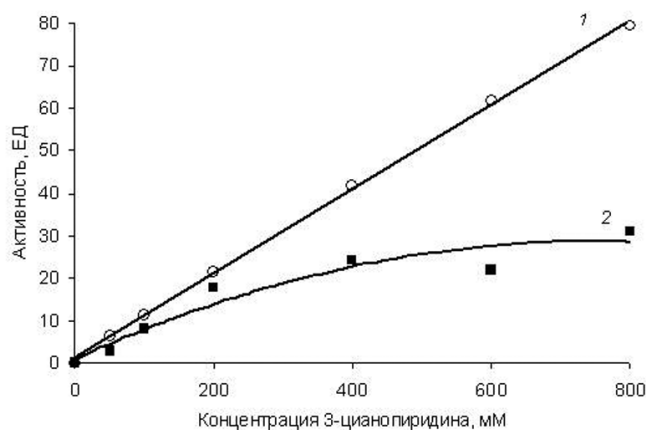


Рис. 2. Зависимость активности свободно-сuspended-ванных (1) и иммобилизованных на карбонизированных волокнах Урал ТМ-4 (2) клеток *R. ruber* gt1 от концентрации 3-цианопиридина

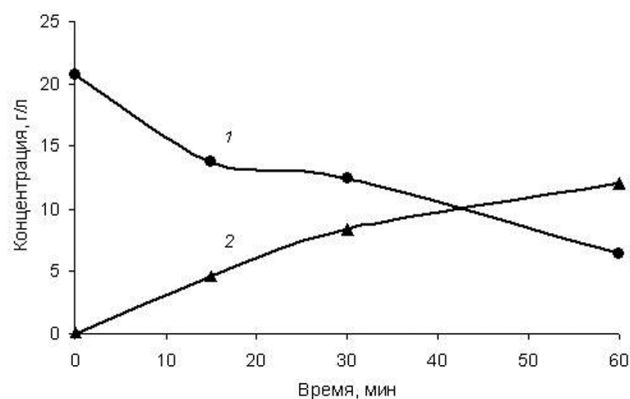


Рис. 3. Трансформация 200 мМ раствора 3-цианопиридина (1) в никотиновую кислоту (2) свободно-сuspended-ванными клетками *P. fluorescens* C2

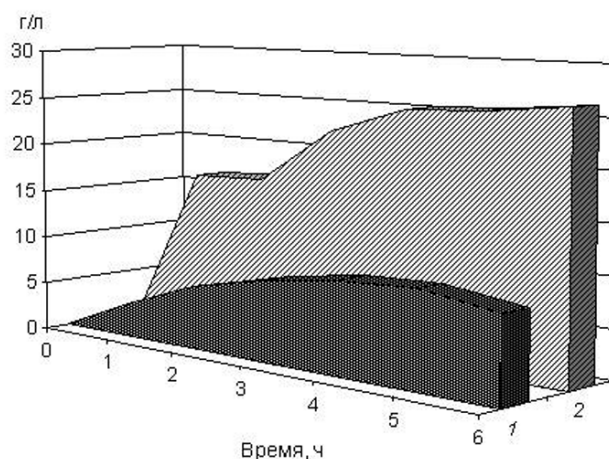


Рис. 4. Получение концентрированного раствора никотинамида (г/л) иммобилизованным (1) и свободно-сuspended-ванным (2) биокатализатором

Заключение

Нитрил-гидролизующие бактерии, обладающие высокой нитрилгидратазной активностью по отношению к ароматическим нитрилам, могут быть эффективно использованы для трансформации 3-цианопиридина в никотинамид. Бактерии, содержащие нитрилазу, гидролизуют данный субстрат до никотиновой кислоты.

Гетерогенный биокатализ, в отличие от гомогенного, дает ряд преимуществ, среди которых легкость отделения биокатализатора от среды, возможность создания непрерывных технологий, снижение количества отходов, в ряде случаев — стабилизация ферментативной активности. Успешность этого процесса во многом зависит от правильного подбора метода иммобилизации и носителей. В то же время необходимо принимать во внимание особенности биокаталитического процесса и природу трансформируемого субстрата.

Так, ранее нами было показано, что активность нитрилгидратазы и нитрилазы иммобилизованных на углеродсодержащих носителях клеток тех же штаммов при конверсии алифатического субстрата акрилонитрила повышается по сравнению с активностью свободно-сuspended-ванных клеток; причем наиболее предпочтительными для иммобилизации родококков были активированные углеродные адсорбенты [2, 4]. В случае конверсии ароматических субстратов, в частности, 3-цианопиридина, использование активированных углеродных материалов в качестве носителей клеток не давало таких преимуществ из-за адсорбции субстрата и продукта.

Таким образом, биотрансформация 3-цианопиридина более эффективно протекает в гомогенных условиях, а преимущества гетерогенного биокатализа в данном процессе заключаются только в технологических моментах, таких как возможность осуществления непрерывной конверсии, упрощение отделения биокатализатора от среды и снижение количества отходов.

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. Забазная Е.В., Козулин С.В., Воронин С.П. Отбор штаммов, трансформирующих акрилонитрил и акриламид в акриловую кислоту // Прикл. биохим. микробиол. — 1998. — Т. 34. — № 4. — С. 337–381.
2. Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Кузнецова М.В., Олонцев В.Ф., Демаков В.А. Иммунизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью // Прикл. биохим. микробиол. — 2007. — Т. 43. — № 2. — С. 193–198.
3. Максимова Ю.Г., Коваленко Г.А., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Чуенко Т.В., Рудина Н.А. Иммунизированные нерастущие клетки *Rhodococcus ruber* как гетерогенные биокатализаторы для процесса гидратации акрилонитрила в акриламид // Катализ в промышленности. — 2008. — № 1. — С. 44–50.
4. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах // Биотехнология. — 2010. — № 4. — С. 51–58.
5. Яхонтов Л.М., Глушков Р.Г. Синтетические лекарственные средства / Под ред. А.Г. Натрадзе. — М.: Медицина, 1983. — 272 с.
6. Almatawah Q.A., Covan D.A. Thermostable nitrilase catalysed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine // Enzyme Microb. Technol. — 1999. — Vol. 25. — P. 718–724.
7. Cantarella L., Gallifuoco A., Malandra A., Martinkova L., Pasquarelli F., Spera A., Cantarella M. Application of continuous stirred membrane reactor to 3-cyanopyridine bioconversion using the nitrile hydratase-amidase cascade system of *Microbacterium imperiale* CBS 498-74 // Enzyme Microb. Technol. — 2010. — Vol. 47. — P. 64–70.
8. Kaplan O., Nikolaou K., Pisvejcova A., Martinkova L. Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi // Enzyme Microb. Technol. — 2006. — Vol. 38. — P. 260–264.
9. Ovchinnikova E.V., Andrushkevich T.V., Shadrina L.A. Kinetics of the oxidation of β -picoline to nicotinic acid over vanadia-titania catalyst. 1. The network of the reaction and the effect of water // React. Kinet. Catal. Lett. — 2004. — Vol. 82. — N. 1. — P. 191–197.

BIOCATALYTIC TRANSFORMATION OF 3-CYANOPYRIDINE BY IMMOBILIZED AND SUSPENDED CELLS NITRILE-UTILIZING BACTERIA

Ju.G. MAKSIMOVA¹, D.M. VASILYEV², G.V. OVECHKINA¹, V.A. DEMAКOV^{1,2}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS,

² Perm State National Research University, Perm

Transformation of 3-cyanopyridine to nicotine amide was catalyzed by free and adsorbed on carbon carriers *Rhodococcus ruber* gt1 cells and suspended *Pseudomonas fluorescens* C2 cells. Nitrile hydratase activity of *Rhodococci* immobilized on carbonized carbon fibers Ural TM-4 for the conversion of 200 mM 3-cyanopyridine was 18 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ and did not rise with increasing concentration of the substrate, whereas the free cells activity was in a linear function of the substrate concentration within range studied (50–800 mM). Activated carriers were not preferred to immobilize cells in the biocatalytic process because they adsorbed to the substrate and the reaction product. Nitrilase activity of *P. fluorescens* C2 was 0.8–0.9 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. A nicotine amide solution of 26 g/l was obtained in 6 h under substrate fractionating to a concentration of 200 mM in each hour; the reaction was catalyzed by 0.6 g/l of suspended *R. ruber* gt1 cells.

Keywords: 3-cyanopyridine, biocatalytic transformation, nitrile-utilising bacteria, *Rhodococci*, *Pseudomonads*.

ВЕРМИКУЛЬТУРА: ИННОВАЦИОННЫЕ ЭКОТЕХНОЛОГИИ РЕЦИКЛИНГА БЫТОВЫХ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ИНДУСТРИАЛЬНЫХ ОРГАНОСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ

И.Н. ТИТОВ*

Владимирский государственный университет

В обзоре рассмотрено современное состояние проблемы вермикультур в мире и перспективы внедрения данного экологически чистого биотехнологического метода в России. Проанализированы преимущества и недостатки разных технологических подходов к практической организации производств на основе вермикультур.

Ключевые слова: вермикультуры, биотехнология.

Введение

Несмотря на то, что важность дождевых (компостных) червей в переработке органосодержащих отходов была известна давно, только в последние два-три десятилетия о них говорят и пишут повсеместно и повсюду. Их роль, значение и важность теперь рассматриваются весьма широко от «друзей фермера» до «инженера окружающей среды» и уникального «утилизатора органосодержащих отходов». За более чем полувековой период применения вермикультуры в разных странах мира было использовано множество различных технологий для переработки органосодержащих отходов и выращивания биомассы компостных червей. Однако только недавно значительный потенциал использования компостных червей в системах переработки органических отходов для получения вермикомпостов был изучен более глубоко и стал основой для вермииндустрии в некоторых странах мира (Edwards С.А., Neuhauser E.F., 1988) [19]. На основе многочисленных научных исследований по биологии, биохимии, молекулярной биологии и генетике дождевых червей были разработаны совершенно новые и уникальные технологии вермикультивирования и вермикомпостирования, которые произвели настоящую революцию в области вермикультуры.

Сейчас хорошо известны, широко применяются и представляют большой интерес как самые простые технологии, требующие больших затрат человеческого труда, так и полностью автоматизированные системы, которые должны обслуживаться оператором. К сожалению, в России до сих пор распространены старые и относительно низкоэффективные вермитехнологии. Цель этого аналитического обзора состоит в описании практически всех известных в мире вермитехнологий с оценкой их преимуществ и недостатков.

Вермикомпостирование твердой фракции органосодержащих отходов

Из общего числа 4400 известных и описанных к настоящему времени видов земляных, или дождевых, червей детальным экологическим исследованиям были подвергнуты не более 20 видов (Blakemore R.F.A., 2005) [10]. Из них в качестве вермикультуры в разных странах мира используется широко для различных целей только 10–12 видов, главным образом, это поверхностно-обитающие компостные черви-эпигеики. Они очень активны в вермикультуре и быстро поглощают большие количества органических отходов, находящихся близко у поверхности вермисистемы.

Критическим моментом для успешного вермикомпостирования является то, что необходимо регулярно добавлять органические отходы на поверхность тонкими слоями через короткие интервалы так, чтобы любое нагревание в результате активности термофильных микроорганизмов, которое может происходить, не стало чрезмерным и опасным для компостных червей. При умелом обслуживании вермисистемы это выделяемое тепло

© 2012 г. Титов И.Н.

* **Автор для переписки:**

Титов Игорь Николаевич

к.б.н., ст.н.с., старший преподаватель кафедры физиологии, анатомии, химии и жизнеобеспечения естественно-географического факультета Владимирского государственного университета 600035 Владимир, ВлГУ, пр-т Строителей, 11.

E-mail: tit421@mail.ru

может способствовать активной деятельности дождевых червей в более холодные периоды в странах с умеренным климатом (Edwards С.А., 2011) [15, 16].

Имеются следующие типы вермисистем: бурты (грядная технология), ложа, контейнеры и автоматические реакторы непрерывного действия. Каждый тип вермитехнологии имеет много вариантов. Вермисистемы статичные — это, когда подготовленный базовый субстрат и кормовой субстрат смешиваются, компостные черви заселяются и вся система оставляется до тех пор, пока процесс вермикомпостирования не завершится. Вермисистемы непрерывного действия — это такие, в которых компостных червей после заселения в базовый субстрат регулярно подкармливают и новые порции кормового субстрата добавляют на поверхность, а конечный продукт регулярно удаляется из вермисистемы (Титов И.Н., 2012) [6].

При средне- и крупномасштабном вермикомпостировании ведется обязательный контроль температурных режимов, что редко требуется при вермикомпостировании в небольших масштабах. Крупномасштабные системы выделяют гораздо больше тепла от разложения больших объемов органических отходов и удерживают его дольше, чем малообъемные вермикультиваторы. Оператор также должен следить за солнечной радиацией, поглощаемой самой системой или окружающей ее внешней средой. Наиболее часто в самой системе вермикомпостирования используются такие способы понижения температуры, как добавление воды, вентиляция воздуха внутри системы или вокруг нее, уменьшение количества добавляемого для переработки сырья.

Для того чтобы выбрать подходящую систему и технологию вермикомпостирования, необходимо учитывать следующие факторы:

- количество и тип органосодержащих отходов (сырья), которые должны подлежать переработке;
- месторасположение вермихозяйства;
- климат и метеоусловия;
- имеющееся оборудование, требуемое для переработки органических отходов;
- наличие дешевой рабочей силы;
- объем финансирования.

Самые крупные предприятия по вермикомпостированию находятся, как правило, вблизи больших животноводческих ферм и способны перерабатывать большие объемы органических отходов различного происхождения. Мелкие вермихозяйства вынуждены или покупать органические отходы, или затрачивать деньги на их транспортирование. Домашние системы вермикуль-

тивирования могут находиться либо в квартире и доме, либо вне дома, в гараже, на садовом участке.

Основной принцип всех систем вермикомпостирования основан на добавлении органических отходов через короткие и регулярные интервалы времени в измельченном виде тонким слоем на поверхность этой системы, что позволяет компостным червям перемещаться к ним, поглощать их и переваривать. Компостные черви будут всегда продвигаться, собираться и концентрироваться в верхнем слое органических отходов, который имеет толщину 10–15 см, и продолжать продвигаться постоянно вверх, так как каждый следующий слой органического корма регулярно добавляется. Многие из операций технологии вермикомпостирования могут быть механизированы и автоматизированы. Но необходимо соблюдать разумный баланс между стоимостью автоматизации и механизации процессов вермикомпостирования и стоимостью использования рабочей силы для достижения того же результата. Ключевой момент — это максимальная продуктивность по конечному продукту (вермикомпосту) при самой высокой скорости размножения компостных червей и поддержании оптимальных параметров аэробности, влажности и температуры в поддерживающем субстрате; при этом следует избегать использования органических отходов с чрезмерными количествами аммиака и солей. Добавление органических отходов тонким слоем дает возможность избежать перегрева системы, но этого достаточно, чтобы поддерживать оптимальную температуру для роста компостных червей в холодные зимние периоды [15].

Практически любые виды бытовых сельскохозяйственных, муниципальных или промышленных органосодержащих отходов могут использоваться для вермикомпостирования, но для некоторых, возможно, понадобится некоторая предварительная обработка перед использованием, чтобы сделать их приемлемыми для компостных червей. Такие предварительные обработки могут включать в себя промывку, предварительное компостирование, измельчение или смешивание с органическим веществом. Смесь нескольких различных видов отходов может быть переработана более эффективно, чем однотипные отходы, так как при этом легче поддерживать аэробные условия при оптимальном уровне влажности и, как правило, получается более качественный конечный продукт.

Система буртов (вермибуртов), или грядная технология вермикомпостирования (английский термин — «windrow vermicomposting system») — это давний и традиционный низкотехнологичный метод

средне- и крупномасштабного вермикомпостирования органических отходов (Дереневский С.П. и др., 1994 [1]; Морев Ю.Б., 1990 [3]; Edwards С.А., 2004 [12]). Вермикомпостирование в вермибуртах или вермигрядах может осуществляться самыми различными способами.

Стационарные бурты или гряды — это просто кучи из органических отходов различной высоты, ширины и длины, содержащие смесь базового субстрата с кормовым субстратом, которые заселяют вермикультурой. Эта система вермикомпостирования обязательно требует, чтобы созданные бурты укрывались от прямого солнечного света. Для этого в регионах с жарким климатом используются навесы или их располагают в отапливаемых помещениях в зимние периоды сезона в регионах с холодным климатом. При закладке нового бурта на твердый ровный пол настилают слой (основание или подушку) из предварительно подготовленного базового субстрата высотой 10–15 см и шириной от 0,6 до 2,5 м, что позволяет регулярно обслуживать их для подкормки или увлажнения, а также контролировать температуру, влажность и значение рН субстрата. Но они не должны иметь высоту более 1,0–1,2 м. Это нужно для того, чтобы обеспечить хорошие условия для жизнеобитания популяции компостных червей. Длина буртов менее всего важна и зависит только от размеров площадки и помещения, где их формируют.

Компостных червей можно до их инокуляции в бурты содержать в каких-либо ящиках или коробках. Компостных червей регулярно подкармливают, настилая на подготовленное основание бурта с инокулированными в нее червями до тех пор, пока высота бурта не достигнет определенной высоты и будет иметь трапециевидную или округлую форму. Бурты должны осматриваться визуально ежедневно и, когда поверхность бурта становится мелкоструктурированной, то настиляется следующий слой толщиной в 5–7 см кормового субстрата. Настилая более толстый слой корма для компостных червей не следует, потому что он препятствует проникновению кислорода внутрь базового субстрата бурта. Это может заставить компостных червей мигрировать в верхний слой бурта прежде, чем более нижележащие слои будут полностью переработаны и переварены биомассой червей, что может создавать зоны анаэробного брожения. Вермибурты орошаются водой с помощью разбрызгивателей 1–2 раза в день, чтобы поддерживать оптимальную влажность 70–80% во всем субстрате бурта.

Систему стационарных буртов можно использовать как в помещениях, так и вне помещений, но такая система требует большой площади земли или больших

помещений. Кроме того, в северных широтах во время зимы такой способ достаточно сложно и дорого применять. В летний период имеется большая опасность вторичного обсеменения семенами сорных растений, если бурты размещаются вне помещений, что резко снижает ценность конечного продукта вермикомпоста. Получить вермикомпост отдельно без компостных червей достаточно сложно, так как при больших объемах перерабатываемых органических материалов необходимо использовать специальный сепаратор или вермикомбайн (устройство для отделения компостных червей и их коконов от вермикомпоста).

При использовании системы стационарных буртов нужно отделять биомассу компостных червей — продуцентов вермикомпоста — от конечного продукта вермикомпостирования с помощью специального сепаратора или подготовить новые бурты, чтобы в них компостные черви могли мигрировать из переработанных буртов.

Бурты нежелательно размещать на почве, чтобы не загрязнять вермикомпост землей при сборе вермикомпоста-сырца. Эта технология имеет два преимущества: низкие капитальные затраты и простое обслуживание. Такие системы требуют больших площадей земли для крупномасштабного производства биомассы компостных червей и вермикомпоста и являются относительно трудоемкими, даже когда используются машины для того, чтобы добавить органические отходы на вермиложу или собрать вермикомпост. Еще более важно то, что система вермигряд перерабатывает органические отходы относительно медленно, процесс продолжается от 6 до 18 месяцев, чтобы переработать слой отходов 45 см глубиной; особенно тогда, когда зимы являются холодными. В течение такого длительного периода вермикомпостирования, как правило, происходят существенные потери питательных веществ для растений в конечном продукте в результате улетучивания или выщелачивания.

Главный недостаток — это трудность в сборе урожая конечного продукта вермикомпоста от компостных червей. Для этого надо сепарировать все содержимое буртов с помощью барабанного сита или другим способом, чтобы отделить компостных червей от вермикомпоста. Таким образом, начальные издержки капитала, кроме стоимости земли и помещения, являются низкими, трудовые затраты высокие, а скорость переработки отходов очень низкая.

Система вермикомпостирования в стационарных буртах до сих пор широко применяется в условиях сурового российского климата. Так, например, имеется большой практический опыт полевого круглогодичного

вермикомпостирования в условиях резко континентального климата Западной Сибири.

Было показано, что в условиях длительных зим с устойчивыми морозами при значительной мощности снежного покрова экономически выгодно и экологически целесообразно осуществлять вермикомпостирование непосредственно на паровом поле, нуждающемся в биологической рекультивации (Чичерин Г.М., 1994 [7]; Терещенко Н.Н., 2001 [5]). Для зимнего содержания нарастающего поголовья компостных червей создаются специальные, увеличенные в размерах и укрытые соломой бурты, в которых обеспечивается и необходимый запас корма для популяции компостных червей на всю зиму, и удовлетворительные условия для жизнедеятельности и даже воспроизводства червей, так как температура внутри бурта зимой не опускается ниже +6 °С.

Весной бурты вскрываются и трансформируются в бурты оптимальных размеров, которые используются для получения вермикомпоста и воспроизводства компостных червей либо для внутренних потребностей самого производителя, либо в коммерческих целях. Непереработанные компостными червями остатки буртов (как правило, их нижние слои), но претерпевшие преобразование за счет компостирования, могут использоваться в качестве органического удобрения на полях. На следующий год вермикомпостирование перемещается на соседнее поле, которое отводится под пар, а прошлогоднее поле после проведения на нем вермикомпостирования отвально запахивается и используется под выращивание конкретной сельскохозяйственной культуры. Таким образом, в результате планомерного применения технологии круглогодичного вермикомпостирования происходит последовательная пространственно-временная биологическая рекультивация пахотных земель, что особенно важно с агрономической точки зрения для нечерноземной зоны России.

Несмотря на то, что зимой уменьшаются скорость и эффективность вермикомпостирования по сравнению с таковыми в закрытых и отапливаемых помещениях, это позволяет максимально снизить капитальные затраты. Подобные бурты могут быть установлены на фермах, используя навоз животных, силос и другие высокоуглеродистые материалы в качестве базовых субстратов и смешивая их с кормами, содержащими азотсодержащие вещества, такими как помет домашней птицы, морские водоросли или частично предварительно компостированные пищевые отходы. После создания буртов популяции компостных червей могут быть поддержаны и увеличены с помощью создания рядом нового бурта из свежего

базового субстрата, в который из прошлогоднего бурта будут перемещаться компостные черви в течение лета. Прошлогодний бурт может быть удален для дальнейшей переработки, а вермикомпост применяется сразу или оставляется для использования до следующей весны.

Бурты не нужно ворошить или переворачивать, но они должны орошаться водой или покрываться. Для поддержания вермикультуры в оптимальных условиях влажность базового субстрата должна быть выше 70%, но не ниже 60%. Влажность в субстрате может быть сохранена, если покрывать бурты. Предпочтительно применять материалы, которые «дышат», например, старая и использованная мешковина.

Если используется пленка, то несколько отверстий в ней позволят достаточному количеству воздуха проходить в субстрат. Если субстрат будет иметь влажность более 80%, то хорошее покрытие будет поддерживать уровень влажности достаточно высоким, чтобы способствовать работе компостных червей. Оба вида покрытия также предотвратят выщелачивание питательных веществ в основание бурта.

В регионах с чрезвычайно холодными зимами можно защитить бурты от промерзания, покрывая их соломенными матами или другим теплоизолирующим материалом. Конечно, это требует больше работы, но в комбинации с кормовым субстратом, содержащим много азотистых веществ, это может функционировать весьма хорошо даже и в холодные зимы.

Преимущества и недостатки системы вермикомпостирования в грядах или буртах представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристики грядной системы вермикомпостирования (по Edwards С.А., 2011) [15]

Преимущества	Недостатки
Низкие капитальные затраты. Простота обслуживания.	Интенсивный ручной труд. Необходимость иметь большие площади земли. Медленный процесс переработки. Существенные потери питательных веществ при выщелачивании и улетучивании. Невозможность сбора вермикомпоста, свободного от дождевых червей.

Клиновое вермикомпостирование (английский термин — «wedge vermicomposting system») была разработана в Великобритании К. Эдвардсом и его коллегами из Ротамстедской станции в содружестве с другими специалистами из Национального института сельскохозяйственного машиностроения (Edwards C.A. et al., 1985) [18] и является модификацией системы стационарных вермибуртов, описанной выше. При ее использовании требуется существенно меньшая рабочая площадь, а также она более проста и эффективнее для производства вермикомпоста, поскольку исключается необходимость в отделении биомассы компостных червей от вермикомпоста-сырца. Особенность этой технологии основана на регулярном добавлении тонких слоев (5–10 см) органических отходов на базовый субстрат с вермикультурой, имеющий треугольную форму с наклоном 45° от вертикального сменного барьера. Система клина может быть любой ширины или длины, но должна быть ограничена в высоте (не более 1,2 м) для простоты обслуживания. Она должна располагаться на бетонном полу или на какой-либо твердой поверхности. Стартовая популяция компостных червей в базовом субстрате помещается между стенками типа загона с тремя сторонами, торцевая сторона которого является тем самым сменным барьером. Наличие стенок загона обеспечивает ряд преимуществ, включая термоизоляцию базового субстрата зимой и влагоудерживание; поэтому клиновое вермикомпостирование можно назвать как систему трехстороннего короба, или загона.

Органические отходы наслаиваются послойно до тех пор, пока не сформируются бурты с углом наклона 45° . Бурты могут размещаться в закрытых помещениях и вне их на открытых площадках, но в последнем случае необходимо накрывать их брезентом, специальной пленкой или слоем компоста, чтобы избежать потери питательных веществ за счет их выщелачивания. Для того чтобы получились бурты шириной от 1 до 3 м в ширину, используется фронтальный буртоукладчик. Длина буртов может быть ограничена только размерами участка земли или помещения.

Компостные черви мигрируют быстро из базового субстрата стартового бурта в слой свежего кормового субстрата, а затем из этого полностью переработанного слоя органических отходов — в свежий слой корма и, таким образом, собираются на поверхности клина бурта. Вся популяция взрослых червей находится главным образом в слое толщиной 15–20 см. Через определенное время (например, через 1–2 месяца), когда клиновая поверхность бурта сместится на расстояние около 1 м, сменный

барьер убирают, переработанную массу вермикомпоста-сырца можно удалить на переработку, а сменный барьер перемещают на расстояние около 1 м. В отобранном вермикомпосте-сырце практически не будет компостных червей, так как вся популяция находится в противоположной зоне клина. Переработка органических отходов в системе клина занимает приблизительно 3–4 месяца.

Свежий корм добавляется регулярно согласно графику кормления с четвертой открытой стороны, которая имеет угол наклона около 45° , обычно с помощью фронтального погрузчика. Практически вся популяция взрослых особей компостных червей перемещается в слой свежего корма, оставляя за собой уже переработанный материал. Когда бурт достигнет противоположного конца рабочей площадки, можно конечный продукт собрать, удалив заднюю стенку загона, с помощью фронтального погрузчика. Операция по добавлению свежих порций корма повторяется, но движение бурта клиновой системы изменяется на 180° , то есть на противоположное направление.

Используя эту технологию, популяция компостных червей не должна отделяться от вермикомпоста, а процесс может быть продолжен неопределенно долго. Во время самых холодных месяцев теплоизолирующий слой сена или соломы может быть помещен на активно работающую часть клина. Такие загоны могут быть любой ширины, что зависит от размера площадки или помещения, и единственным ограничением является доступность оператору активно работающей зоны клиновой системы вермикомпостирования для контроля и корректирующих операций уровней значения рН и влажности субстрата. Ширина загона около 1,8 м является идеальной. Идеальная длина загона будет зависеть от вида перерабатываемого материала, численности популяции компостных червей и других факторов, влияющих на продолжительность переработки органических отходов.

Клиновое вермикомпостирование при равных условиях на единицу вермипродукции обладает достоинствами по сравнению с системой статичных вермибуртов, так как требуется меньше производственных площадей, предотвращается слеживание нижних слоев вермикомпоста-сырца благодаря горизонтальной миграции компостных червей. Преимущества и недостатки клиновой системы вермикомпостирования суммированы в таблице 2.

Система «самоперемещаемых» буртов. Данная система вермикомпостирования — это усовершенствованная модификация клиновой системы вермикомпостирования, которая была разработана профессором К. Эдвардсом из Университета штата Огайо (Колумбус, США). Такая

система вермикомпостирования объединяет в себе известные фермерские технологии с новыми технологиями, для того чтобы перерабатывать и биоконвертировать большие объемы разнообразных органических отходов в вермикомпост.

Таблица 2

Особенности клиновой системы вермикомпостирования (по Edwards С.А., 2011) [15]

Преимущества	Недостатки
<p>Низкие капитальные затраты.</p> <p>Меньшая потребность в ручном труде, чем при грядной технологии.</p> <p>Более быстрая переработка отходов.</p> <p>Меньшие потери питательных веществ от выщелачивания или улетучивания.</p> <p>Легкий сбор вермикомпост-сырца, свободного от дождевых червей.</p>	<p>Потребность в технике для наслоения органических отходов.</p>

Преимущество этой технологии состоит в том, что использование ее позволяет экономить фермерам и время, и деньги без потери и снижения качества конечного продукта вермикомпоста. Технология проста и требует минимального обучения. Затраты на старт технологии минимальны. Биоконверсия органических отходов в вермикомпост происходит в естественных условиях и за относительно короткий промежуток времени.

Технология основана на основном инстинкте дождевых червей — взрослые особи постоянно мигрируют в зону, наиболее комфортную для их обитания, то есть туда, где имеются достаточные количества качественного пищевого субстрата, а также где оптимизированы температурные параметры, оптимальные уровни аэрации, значений рН окружающей среды и влажности. В такой зоне происходит накопление и концентрирование взрослых особей червей до максимально возможной плотности популяции, и она становится сверхактивно работающей в зоне бурта, где происходит более быстрая и более полная переработка органических веществ в конечный продукт — вермикомпост.

В статичных (неподвижных) вермибуртах подкормка компостных червей осуществляется наслаиванием кормового субстрата сверху. Черви перемещаются вслед за кормом снизу вверх в вертикальном направлении. По мере увеличения высоты бурта происходит уплотнение его нижних слоев, что приводит к дефициту кислорода и

избыточной влажности в нижних слоях вермикомпоста. В бурте возникают так называемые «мертвые» анаэробные (практически «бескислородные») и переувлажненные зоны, что отрицательно сказывается на качестве конечного продукта.

Система «самоперемещаемого» вермибурта способствует устранению такого недостатка. Для этого в данной технологии вермикомпостирования предлагается производить подкормку технологической популяции компостных червей и увлажнение базового и кормового субстратов только с одной боковой стороны сформированного бурта, заставляя популяцию взрослых компостных червей, как и в клиновой системе, двигаться в горизонтальном направлении. Первоначально из предварительно ферментированного органического субстрата готовят базовый субстрат, из него на бетонированном полу устраивают основание (подушку) будущего вермибурта, то есть слой базового субстрата шириной 0,6–2,4 м и высотой 15–20 см. Длина такой подушки из ферментированного органического материала лимитируется длиной площадки для вермикомпостирования или длиной крытого отапливаемого помещения.

Затем данный субстрат заселяется популяцией компостных червей вида *Eisenia fetida* из расчета 0,3 кг (1500 особей) на 1 м². Через 7–10 дней наслаивают сверху кормовой субстрат слоем в 7–10 см и увлажняют. Эти операции повторяют регулярно до тех пор, пока высота бурта не достигнет 60–90 см. С этого момента наслаивание подготовленного ферментированного кормового субстрата для компостных червей и увлажнение осуществляют только с одной стороны сформированного стационарного бурта. Подкормку вермикультуры начинают наслаиванием кормового субстрата раз в 2–3 дня слоем толщиной до 5–7 см только с одной стороны. Увлажнение бурта осуществляется также только со стороны, на которую наслаивают свежий корм. Практически вся популяция взрослых половозрелых особей компостных червей перемещается поперек бурта в горизонтальном направлении в зону свежей, влажной и аэрируемой подкормки. В этой зоне, имеющей толщину 15–20 см, концентрация червей, перерабатывающих органику, достигает максимально возможного уровня для промышленной популяции червей (до 350 тысяч особей/м³).

Это приводит к созданию так называемой активно работающей зоны вермикомпостирования. Для поддержания оптимальных условий (аэрация, температура и влажность) для культивирования дождевых червей в данной зоне накрывают эту активно работающую зону

(одну сторону бурта) нетканым материалом. В результате такого одностороннего насаивания и увлажнения корма на сформированный бурт происходит его одностороннее наращивание и продвижение. Противоположную сторону бурта освещают слабым светом и обдувают током теплого воздуха с помощью вентиляторов. Это способствует более полному «изгнанию» червей и частичному подсушиванию слоя переработанного субстрата, содержащего копролит компостных червей. Таким образом, при постоянном насаивании свежей и увлажненной подкормки для компостных червей на одну из сторон бурта при одновременном отбирании переработанного субстрата с противоположной стороны происходит перемещение самого бурта в одном направлении, то есть вермибурт из стационарного превращается в медленно смещаемый (подвижный) в пространстве, «самоперемещаемый» или «шагающий» вермибурт.

Горизонтальное перемещение биомассы компостных червей в субстрате бурта вслед за свежим кормом по сравнению с вертикальным перемещением имеет следующие важнейшие преимущества:

- многократное увеличение биомассы компостных червей;
- возможность увеличить высоту вермибурта до 1 м без риска дефицита кислорода;
- возможен отбор слоя вермикомпоста-сырца, который «самоосвобождается» от биомассы компостных червей.

Данная технология не была запатентована до последнего времени ни в одной стране мира. Но эта система вермикомпостирования была адаптирована к российским условиям и запатентована в России (Конин С.С. и др., 2004) [2].

Система ложа, или вермиложа (английский термин — «bed vermicomposting system») заключается в том, что вермикультура находится заключенной в 4 стенках, чем отличается от клиновой системы с тремя стенками, а подкормка вермикультуры происходит подачей корма сверху. Ложа располагают обычно на полу или земле, но часто внутри неотапливаемого здания, типа сарая. Вермиложе может иметь изолированные стенки из дерева, бетонных блоков, полого кирпича и других материалов. Соломенные блоки, как и в других устройствах, могут использоваться для того, чтобы утеплить ложа в зимнее время. Если ложа являются довольно большими, то они должны быть защищены от ветра и осадков простыми мешками или соломенными матами. Кроме того, базовый субстрат в зимний период должен содержать достаточные количества азотсодержащих веществ. Это позволяет

увеличивать промежутки времени между операциями подкормки.

Площадки, отведенные под вермикомпостирование в указанных системах, соответствующим образом оборудуют. Например, в крупных американских хозяйствах к ним обычно подводят воду и свет. Все расчеты, связанные с устройством гряд, кормлением червей, уходом за ними, сбором вермипродукции, выполняют со ссылкой на так называемое стандартное ложе размером $2 \times 1 \times 0,4$ м или площадью 2 м^2 . Максимальный объем вермиложа составляет при полном его заполнении $0,8 \text{ м}^3$. На одном гектаре возможно разместить около тысячи таких лож (Ferruzzi С., 1984) [20]. При всех подсчетах для определения производительности, кормления, размножения и т.д. принято исходить из того, что стандартное ложе содержит 100000 компостных червей на разной стадии развития. Одно такое ложе может производить ежегодно до 1–1,2 тонны вермикомпоста и до 30–50 кг биомассы компостных червей.

В боковых стенках ложа, сделанных из досок, нет необходимости заделывать образующиеся между досками щели — лучше будет аэрация базового субстрата. Если расстояние между боковыми сторонами составляет 2 м, то через каждый 1 м делаются продольные перегородки из досок. Длина ложа вне помещений может достигать 50 м. Для удобства обслуживания лож между ними должны быть предусмотрены проезды для техники. Если ложа размещены в помещении с площадью, позволяющей использовать технику, то как в начале, так и в конце рядов лож необходимо спланировать свободные места (площадки) для проезда и разворота механических средств.

Более усовершенствованной системой вермиложа стала так называемая система ванны («batch vermicomposting system»). Эта система отличается тем, что торцовые стенки такого вермиложа-ванны являются съемными. Обычно такая технология используется вне помещения. На бетонированной площадке сооружаются из бетонных блоков боковые стенки высотой до 60–80 см. Расстояние между ними должно быть таким, чтобы во внутрь возможен был заезд специальной техники (фронтального трактора-погрузчика) для сбора биомассы компостных червей и вермикомпоста (Edwards С.А., 2011) [16].

Длина таких устройств ограничивается только размерами рабочей площадки. Затем на дно площадки между боковыми стенками насаивается слой предварительно подготовленного базового субстрата толщиной до 15 см. Торцовые стенки ставят на свои места и получается

«ванна» в виде параллелепипеда. Базовый субстрат инокулируют вермикulturой по 10000 взрослых червей на 1 м². После ухода червей в глубь субстрата начинают регулярную подкормку сверху кормовым субстратом слоем по 5–7 см и увлажнение. Когда вся емкость заполнится переработанным органическим субстратом, для сбора вермикulturы наслаивают слой свежего корма на всю поверхность вермиложа, удаляют одну торцовую стенку и с помощью ковша фронтального трактора-погрузчика снимают верхний слой корма вместе с компостными червями (около 10 см), который используют для инокуляции нового подготовленного вермиложа. Затем с помощью фронтального трактора-погрузчика выбирают весь вермикомпост до дна и перевозят на следующий технологический участок. Фронтальный трактор-погрузчик продвигается затем в глубь ложа на освободившееся место, и операции по снятию верхнего слоя с вермикulturой и удалению вермикомпоста повторяют до тех пор, пока все содержимое ложа не будет разделено и выбрано и перевезено на технологические участки для дальнейшей их переработки.

Недостатками данной системы вермикомпостирования являются:

- трудность поддержания оптимальной влажности субстрата;
- трудоемкость процесса;
- сбор вермикомпоста, свободного от компостных червей, не возможен без сепарации.

Одним из главных неудобств и недостатков системы буртов, ложа или ванн является то, что для их устройства и для осуществления вермикомпостирования требуются большие площади. Это также относится и к вермикомпостирующим системам клиновых или «самоперемещаемых» вермибуртов. Если все эти системы вермикомпостирования используются вне помещения на открытом воздухе, где место не столь дорого, как внутри различных помещений под крышей, то выращивание компостных червей в закрытом помещении или даже внутри неотапливаемого помещения является дорогим проектом.

Ящичные системы вермикомпостирования (английский термин — «box vermicomposting systems») были подробно описаны Т. Барреттом для фермеров (Barrett T.J., 1947) [9] и Эппельхоф для школьников и садоводов (Appelhof M., 1977) [8]. Для этого можно использовать деревянные или пластиковые ящики, коробки или корзины различного размера. Если одинаковые ящики, заполненные вермикulturой, поставить друг на друга, то такая этажерочная или штабелированная система

вермикulturивирования помогает решить проблемы площади и места, так как максимально используется объем производственного помещения за счет вертикального размещения вермикомпостирующих систем.

Ящики с вермикulturой не должны быть большими и тяжелыми, так как их необходимо снимать и перемещать вручную для обслуживания или использовать для этих целей грузоподъемник, когда они доверху заполнены влажным субстратом с вермикulturой. Принимая же во внимание масштабы производства и массу целиком заполненного ящика с влажным субстратом и вермикulturой, становится совершенно ясно, что ящичная система требует большого объема ручного труда. Использование для этих целей грузоподъемных средств сопряжено со значительными финансовыми затратами и нуждается в эффективном и рациональном техническом решении.

Вермикulturу в такой штабелированной системе необходимо подкармливать и увлажнять непрерывно и регулярно, а это требует постоянного и регулярного обслуживания и контроля. При масштабировании подобной системы вермикulturивирования или вермикомпостирования требуется серьезная технологическая разработка наиболее экономичной схемы всех операций: базовый субстрат должен быть предварительно подготовлен и смешан, затем помещен в ящики, потом в них заселяют популяцию дождевых червей, ящики устанавливаются друг на друга на определенный период времени и после завершения процесса вермикомпостирования их необходимо освободить от содержимого для сепарации и окончательной переработки вермикомпоста (Edwards C.A., 1988) [14].

Однако этот способ в настоящее время широко применяется многими профессиональными производителями вермипродукции в Северной Америке и Канаде, особенно в зимний период. Для этого в конце осени подготовленный базовый субстрат помещают в ящики, заселяют вермикulturой, добавляют кормовой субстрат (смесь коровьего навоза с измельченным картоном), увлажняют, штабелируют в неотапливаемом помещении и оставляют до весны (GEORG, 2004) [21]. Через 6 месяцев систему разбирают и собирают урожай вермипродукции. Вермикultura в такой системе не замерзает зимой, так как разлагающийся навоз выделяет достаточное количество тепла внутри вермисистемы в первые месяцы зимы и поддерживает температуру значительно выше точки замерзания. За этот период весь заложенный органический материал полностью перерабатывается, а популяция компостных червей увеличивается в три раза.

Вермикомпост во всех ящиках бывает зрелым и высококачественным (Munroe G., 2005) [23].

Главный недостаток такой штабелированной системы при сравнении с буртовыми системами — это ее начальная стоимость, поскольку обязательным условием для реализации системы является наличие отопляемого или неотапливаемого помещения, специальных ящиков, отдельного участка смешивания базового субстрата и корма, оборудования для поднятия, перемещения и штабелирования ящиков и разборки штабелей. При небольшом масштабе, конечно, это может все проделываться вручную. Имеется и другой существенный недостаток — это, когда наступает время сбора и сепарации вермипродуктов. Как и при использовании системы стационарных буртов, компостные черви находятся в субстрате с конечными и промежуточными продуктами вермикомпостирования, которые должны быть отделены друг от друга. Для этого необходимо иметь специальный сепаратор барабанного или горизонтального типов или использовать другие способы для отделения компостных червей.

Домашние контейнерные системы вермикомпостирования. Контейнерные системы вермикомпостирования в небольших масштабах для переработки и избавления от садовых отходов и домашних кухонных отбросов (по английской терминологии — «bin vermicomposting systems») широко применяются в настоящее время в домах, школах и даже в тюрьмах в США, Канаде и Австралии. (Appelhof M., 1997) [8].

Для домашних систем вермикомпостирования можно использовать самые простые самодельные ящики или контейнеры. Такие устройства могут быть построены из необработанной древесины или можно использовать просто готовые пластмассовые контейнеры. Деревянный ящик использовать лучше, чем пластмассовый ящик при вермикомпостировании вне помещения. Однако деревянный контейнер менее удобен и более тяжелый, чем пластмассовый контейнер. Самодельные пластмассовые контейнеры дешевле деревянных, но они имеют тенденцию накапливать избыток влаги.

Коммерческие компостеры, особенно разработанные для вермикомпостирования, могут быть куплены от многих производителей. Большинство коммерческих вермиконтейнеров представляет собой пластмассовый контейнер с крышкой и отверстиями для вентиляции и дренажа. Сейчас во многих странах применяются специальные вермиконтейнеры, которые производятся и продаются многими зарубежными фирмами США, Канады, Австралии и Китая. Более того, использование гражданами таких домашних систем вермикомпостирова-

ния поощряется муниципальными властями, потому что переработка на месте кухонных (пищевых) и других домашних отходов снижает количество вывозимого мусора на полигоны и свалки.

Они представляют собой широкий ряд от простых вермиконтейнеров с перфорированными крышками для аэрирования до более сложных коммерчески произведенных и продаваемых устройств этажерочного типа различных размеров, конфигурации и уровня сложности, обычно с сетчатым дном, что позволяет переработанному вермикомпосту проваливаться в нижний контейнер.

Они бывают круглой формы, и такие контейнеры ставятся друг на друга, как у домашнего вермикомпостера Can-O-Worms, которые производятся корпорацией Triformis Corporation, или вермикомпостер прямоугольной формы Worm Factory, производимый в США компанией Nature's Footprint, Inc.

Вермиконтейнеры могут быть размещены внутри дома или снаружи. Люди, у которых имеются вермикомпостеры, размещают их во многих местах дома, в подвалах и гаражах. Они могут быть установлены даже в гостиной, на кухне, ванной, туалете и офисных помещениях.

Корпорация «МФК Точка опоры» (Москва) является первой российской компанией, которая стала рекламировать, продвигать и продавать в России для домовладельцев и садоводов уникальные системы компостирования и вермикомпостирования австралийской компании Tumbleweed для переработки и избавления от кухонных пищевых и садовых отходов. Австралийская компания Tumbleweed является мировым лидером, она разработала несколько типов специальных компостеров для утилизации на месте образования органических отходов для садоводов и вермикомпостеров, которые можно использовать и в условиях загородного сада, и в домашних условиях. Используя компостеры и вермикомпостеры этой компании, можно просто утилизировать садовые и кухонные отходы и получать высококачественные органические удобрения — компосты и вермикомпосты для своего сада и огорода (Титов И.Н., 2012) [6].

Преимущества и недостатки домашних контейнерных вермикомпостирующих систем представлены в таблице 3.

Эти системы полезно применять в школьных проектах для экологического образования и воспитания детей. Одним из примеров успешного использования технологии вермикомпостирования является опыт по переработке пищевых отходов в трех школах г. Бирмингема по программе Технологического инновационного центра. Пищевые от-

ходы школьных завтраков и обедов предварительно обрабатываются препаратом эффективных микроорганизмов BOKASHITM для ускорения процессов компостирования, а затем компостными червями в вермиконтейнерах.

Таблица 3

Особенности домашних систем вермикомпостирования (по Edwards С.А., 2011) [16]

Преимущества	Недостатки
<p>Переработка значительных количеств органических отходов на месте без вывоза их на мусорные свалки.</p> <p>Получение почвосмесей для выращивания растений и почвоулучшителей для домашнего использования.</p> <p>Устранение запахов пищевых отходов.</p> <p>Полезный образовательный инструмент.</p>	<p>Необходимость в осторожном обслуживании, особенно при контроле влажности.</p> <p>Возможность размножения мух.</p>

Эта работа выполняется уже в течение нескольких лет самими школьниками под руководством учителей и студентов, поддерживается Агентством по защите окружающей среды и государственной ветеринарной службой Великобритании. Технология вермикомпостирования и вермикультура были представлены компанией Bubble House Worm Farming Enterprises. Целью этой программы являлось вовлечь детей, родителей и школьный персонал в этот образовательный и воспитательный проект (Thomas K. et al., 2007) [26].

Каждая среднестатистическая городская семья из 3–4 человек ежедневно выбрасывает до 1/4 кг пищевых отходов. В Москве, например, это суммарно составляет до 750 т ежедневно, а в год — до 270 тыс. т органических отходов, пригодных для переработки компостными червями (Нефедов Г.Н., Трувелер К.А., 2002) [4].

Начинать можно с малого — с вермикомпостирования органических отходов дома и на садовом участке. Вермикомпостирование является одной из тех биотехнологий, которые доступны самым широким массам. Она проста и экономически привлекательна как для фермеров, так и для простых обывателей от школьников до пенсионеров.

Для этого нужно немного:

- вермиконтейнер;
- компостные черви;
- субстрат для компостных червей с запасом корма на неделю;

- вода;
- овощные, фруктовые отходы кухни и другие растительные остатки.

Все виды органических материалов могут быть помещены в вермикомпостер, но наибольший успех может быть достигнут при использовании овощных и фруктовых отходов, чайной заварки и кофейной гущи (пакетики и фильтры хороши также). Кроме органики, червям необходимы и минеральные вещества. Особенно им необходим такой элемент, как кальций. Кальций можно добавлять в количестве около 0,5%. Источником его может быть гипс, мел, доломитовая мука. Прекрасным источником кальция является яичная скорлупа. Все минеральные компоненты следует предварительно размалывать в порошок. Хлебные корки должны быть увлажнены прежде, чем быть помещенными в вермикомпостер. Дробление или размол пищевых отходов рекомендуются, поскольку измельченные материалы расщепляются быстрее.

Для жилых многоэтажных зданий с мусоропроводом можно порекомендовать вермикультивирование в подвальных помещениях. В этом случае сбор пищевых отходов можно организовать, установив особые емкости около мусоросборника. Ежедневно в 16-этажном, 4-подъездном доме (256 квартир) можно собирать до 64 кг пищевых отходов, переработка которых даст и вермикомпост, и живых компостных червей. Учитывая высокую стоимость того и другого, можно не только покрыть расходы по вывозу, сбору и переработке отходов, но и дать внушительную прибавку к зарплате дворников.

В городских микрорайонах можно устроить полупромышленную переработку органических отходов в башенных вермикультиваторах. Они занимают небольшую площадь, могут размещаться вблизи или на перерабатывающих предприятиях, дающих большие массы органических отходов. Это позволит отдельным микрорайонам города или крупным перерабатывающим предприятиям избавиться от затрат на обезвреживание органических отходов и затрат на вывоз мусора на свалки.

Автоматические реакторы проточного типа. Концепция вермикомпостирования органических отходов в режиме непрерывного или проточного действия (по английской терминологии это — «continuous flow automated vermicomposting reactor systems») была разработана профессором Клайвом Эдвардсом и его коллегами в Великобритании еще в 1980-х годах (Edwards, 1995; 1998) []. С тех пор эта концепция была одобрена

и на ее основе были разработаны автоматизированные вермиреакторы несколькими американскими компаниями (Oregon Soil Corporation и Pacific Garden Company).

Полноразмерные реакторные системы непрерывного потока составляют в длину 40 м, ширину 2,4 м и состоят из модулей по 2,4 м на металлическом каркасе с фанерными или пластмассовыми боковыми стенками, специально обработанными для защиты от воздействия влаги. Вермикомпостирующая система непрерывного действия работает следующим образом. Компостные черви обитают в приподнятом на высоту 50–70 см над уровнем пола контейнере, обычно прямоугольной формы и шириной не более 3 м.

Длина этого вермиложа ограничивается только размерами помещения. Дно такого вермиложа представляет собой специальную сетку, на которую помещается базовый субстрат, который, в свою очередь, заселяется вермикультурой. Кормовой субстрат добавляется сверху, а конечный продукт удаляется через сетку основания такой коробки, обычно с помощью заслонки с гидравлическим приводом. Преимущество подобной системы состоит в том, что компостные черви никогда не тревожатся в своем вермиложе, корм поступает регулярно сверху, биомасса дождевых червей мигрирует в кормовой субстрат.

Таким образом, вся популяция компостных червей проходит через весь органический слой биореактора, компостируемый микроорганизмами, поглощается и перерабатывается всей биомассой компостных червей, а конечный продукт совместной переработки микроорганизмами и компостными червями в виде вермикомпоста-сырца выходит снизу, просыпаясь через сетку в основании этой системы.

Компостные черви вида *E. fetida* имеет тенденцию кормиться у поверхности вермиложа, а свои копролиты оставлять внизу на дне вермиложа. Способ, обеспечивающий проваливание вниз на пол компостируемого материала, находящегося на дне вермиреактора, — это обычно ряд гидравлически включаемых «заслонок», которые двигаясь у сетки основания, разрушают нижний слой субстрата и позволяют проваливаться переработанному субстрату через сетку вниз на пол (Holcombe D.R., Edwards C.A., 2002) [22].

Один такой вермиреактор, имеющий рабочую площадь 1000 кв. футов (чуть более 90 м²), может перерабатывать 2–3 тонны в день органических отходов (Bogdanov P., 1999) [11]. Эти реакторы функционируют успешно в Великобритании, США, Гонконге и Австралии в течение 12 лет (Edwards C.A., 1998) [17]. Для максимальной и эффективной производительности

указанные вермиреакторы должны размещаться в закрытых отапливаемых помещениях.

Без сомнения, данная система автоматических реакторов непрерывного действия является самой эффективной из известных в настоящее время систем вермикомпостирования. Они, вероятно, представляют собой будущее коммерческого вермикомпостирования. Эти вермиреакторы обладают очень высоким потенциалом, когда обслуживаются соответствующим образом.

Стоимость и обслуживание такого вермиреактора равна стоимости биоферментатора, перерабатывающего подобные количества органических отходов с помощью термофильных микроорганизмов. Например, стоимость полностью автоматизированного вермикомпостирующего биореактора, вырабатывающего за год 1000 тонн вермикомпоста, составляет приблизительно 100000 долларов США (Sherman-Huntoon R., 2000) [24].

Продолжительность обработки органических отходов в автоматизированном вермиреакторе составляет 30–45 дней. Эксплуатационные расходы на их обслуживание чрезвычайно низки, и после того, как система достигает равновесия, она может управляться бесперебойно в течение многих лет. Капиталовложение может быть возвращено через 1–2 года. Считается, что у автоматических вермиреакторов проточного типа имеется намного более высокий экономический потенциал для производства высококачественных вермикомпостов при минимальных потерях материалов в результате выщелачивания или улетучивания. Они вермикомпостируют быстрее и намного эффективнее, чем при использовании вермиград, клиновой системы или вермилож.

Автоматический высокоэффективный реактор непрерывного действия. Эта необычная автоматизированная установка для сверхбыстрой переработки органических отходов была создана в 1997 году американской корпорацией Worm World Inc. (Windle H.N., 2001) [27]. Данную систему правильнее назвать многоярусной конвейерной автоматической системой вермикомпостирования. Вермиложа находятся на поверхностях конвейерных полотен, которые располагаются в целях экономии пространства и площади друг над другом.

Число таких вермилож зависит только от высоты помещения. Корм для компостных червей (пищевые отходы) подается из центрального бункера автоматически. Цикл процесса вермикомпостирования составляет всего 7 дней! Но рекомендуется цикл вермикомпостирования проводить в течение 2–3 недель.

Этот процесс является непрерывным при постоянной подаче свежего корма и ежедневном удалении

вермикомпоста-сырца. Стоимость подобного верми-реактора, располагающегося на площади всего 20 м² и перерабатывающего 1 тонну в сутки пищевых отходов, 40–50 тысяч долларов США. Вермикомпостеры этого типа работают в США, Канаде, Австралии и Южной Корее.

Указанная система имеет очевидные преимущества перед другими методами компостирования органических отходов:

- переработка органических отходов может осуществляться прямо на месте их получения;
- отсутствие потерь питательных веществ;
- отсутствие запахов при утилизации отходов;
- не требуется добавления в перерабатываемые отходы разрыхляющих компонентов;
- производственная площадь минимизирована;
- расходы на электричество для подачи воздуха и освещения минимальны;
- ручной труд исключен, так как процессы кормления, сбора и просеивания автоматизированы.

Все это позволяет снижать эксплуатационные расходы по сравнению с другими автоматизированными системами.

Система может быть использована для переработки коровьего навоза, медицинских отходов, осадков сточных вод и пищевых отходов. Вермиложе для компостных червей в системе Worm Gin представляет собой конвейерную ленту, на поверхности которой фактически и располагается само вермиложе. Толщина вермиложа не более 10 см, и они располагаются поверх друг друга в целях экономии пространства. Две половины автоматизированной установки с закрепленными вермиложами расположены друг напротив друга, а корм подается из центрального бункера вниз посередине между ними. Процесс подкормки компостных червей происходит автоматически равномерно в каждом вермиложе обеих частей установки.

По мере того как содержимое лож (субстрат с компостными червями) движется сверху вниз, вермикомпост падает с их концов на конвейерные ленты и доставляется в сепаратор. Выделения компостных червей (вермикомпост) удаляются, а остатки смешиваются со свежим кормом, чтобы образовать питательную среду, в которой компостные черви живут и размножаются. Эта смесь из свежей подкормки и остатков субстрата, обогащенных микрофлорой, снова поступает в систему.

Преимущества процесса «Worm Gin» перед другими системами вермикомпостирования:

- исключен ручной труд; кормление компостных червей, сбор вермикомпоста и просеивание его автоматизированы;
- уменьшены затраты на электроэнергию;
- отсутствие выщелачивания;
- отсутствие слеживания;
- более эффективное использование площади и объема рабочего пространства.

Очистка сточных вод с помощью технологии вермифльтрации

В настоящее время для очистки сточных вод (бытовых и промышленных) в некоторых странах мира успешно используется биотехнология вермифльтрации с использованием вермиккультуры, то есть дождевых червей. Она обладает рядом некоторых преимуществ перед всеми традиционными способами очистки сточных вод. Эта технология впервые была разработана профессором Хосе Тоха (Jose Toha) в 1992 году в Чили. В последние годы эта технология усиленно внедряется в практику очистки сточных вод в Чили, Индии, Китае, Мексике, Австралии и Бразилии (Sinha R.K., Valani D., 2011) [25].

Технология основана на способности дождевых червей работать как «биофильтры». Они поглощают органические и неорганические поллютанты из сточных вод, переваривают их и выделяют в виде своих экскрементов (копролиты) в окружающую среду. При такой переработке сточных вод (концентрированных или разбавленных) происходит утилизация поллютантов, находящихся в сточных водах, очистка сточных вод, их дезинфекция и детоксикация, а также трансформация органических и неорганических компонентов сточных вод в органико-минеральное высокоценное удобрение – вермикомпост и биомассу дождевых червей, которая может затем служить сырьем для кормовой и фармацевтической промышленности.

Система вермифльтрации не требует сложного и дорогостоящего оборудования, для ее обслуживания нужны минимальные энергетические затраты. Еще одним из существенных преимуществ технологии вермифльтрации является то, что отсутствует газообразование, отсутствуют какие-либо запахи, не образуются осадки сточных вод, что характерно для всех традиционных способов очистки сточных вод. Очень важно еще и то, что система вермифльтрации может работать децентрализованно, то есть на месте образования сточных вод (частные дома, коттеджи, отели,

перерабатывающие предприятия и т.д.). Получаемая очищенная вода содержит в себе основные питательные вещества, так что очень выгодно использовать ее для ирригации фермерских земель и в садоводстве.

Вермикультура в составе вермифилтра при совместном взаимодействии почвенных микроорганизмов, иммобилизованных на биофилтре, способна в результате механизмов поглощения и биодegradации удалять из сточных вод органические и неорганические загрязнители по таким важнейшим показателям качества воды, как БПК₅, более чем на 90%, ХПК — на 80–90%, растворенные вещества — на 90–92% и взвешенные вещества — на 90–95%.

Преимущества технологии вермифилтрации:

- низкая стоимость операций и обслуживания;
- требует мало энергии;
- не образуются осадки сточных вод;
- не используются химикаты;
- не требуется предварительная обработка сточных вод для отделения твердой фракции;
- низкий уровень эмиссии парниковых газов;
- образуются хозяйственно ценные побочные продукты утилизации сточных вод (высокогумусированное органическое удобрение вермикомпост и биомасса компостных червей);
- очищенная вода обогащена питательными веществами (азотом, фосфором и калием) и микроэлементами и может использоваться для ирригации фермерских земель;
- процесс очень гигиеничен при полном отсутствии каких-либо запахов и без эмиссии парниковых газов.

Заключение

В настоящее время дождевые (компостные) черви являются наиболее известными и хорошо изученными почвенными животными, а технология вермикультуры теперь считается одним из приоритетных средств ведения экологически чистого сельскохозяйственного производства и переработки различных органических отходов. Эта инновационная биотехнология проделала полувековой путь от выращивания и продажи компостных червей для рыбацкой приманки до решения глобальных проблем крупномасштабной утилизации органических отходов и устойчивого развития сельского хозяйства. В некоторых странах мира она становится основой вермииндустрии.

Теперь после первой Зеленой революции внимание переключается от сельскохозяйственных систем, кото-

рые основаны на применении минеральных удобрений, агрохимикатов и пестицидов, к системам биологического земледелия, которые основаны на использовании компостированных органических материалов, то есть органических удобрений и биопрепаратов. Вермикомпостирование — это наиболее экологически безопасная и дружелюбная для окружающей среды биотехнология переработки и утилизации биодegradируемых органических отходов и превращения их в материалы с добавочной стоимостью.

Вермикомпостирование — одно из решений проблемы утилизации органических отходов. Оно может уменьшать объемы отходов на свалках и их негативное воздействие на окружающую среду из-за возможности утилизации биологических отходов в местах их образования. Оно также поощряет организацию раздельного сбора и удаления отходов, что приводит к экономии в домашнем, местном, региональном, национальном, континентальном и даже мировом масштабах.

Технология вермифилтрации дает возможность производить очистку сточных вод быстро и просто при минимальных энергетических затратах, без использования дорогостоящего оборудования и при низкой стоимости. Вода становится чистой, детоксицированной, дезинфицированной и может быть повторно использована для технических целей, особенно в сельском хозяйстве, ландшафтном дизайне и садоводстве. Это позволит сохранить огромные количества пресной воды. Технология подходит как для сельских, так и городских территорий и может применяться децентрализованно, что будет снижать нагрузку на станции очистки сточных вод.

Вермикультура должна популяризироваться в сельских районах. Также нужно повсеместно внедрять среди садоводов и огородников технологии переработки органических отходов с помощью вермикультуры. Это создаст возможность превращать садовые и домашние органические отходы в органические удобрения и поможет каждому садоводу и огороднику выращивать на своем приусадебном участке безопасную для здоровья вкусную и ароматную продукцию без применения минеральных удобрений и агрохимикатов — так называемые «биоовощи» и биофрукты».

Тема вермикультуры должна быть включена в образование в рамках идей и проблем управления окружающей средой, формирования окружающей среды, защиты окружающей среды или санитарии. Эта технология должна стать тем инструментом, с помощью которого возможно будет очистить от органических загрязнений воду, землю и воздух.

Таким образом, современные вермифтехнологии необходимо повсеместно пропагандировать и внедрять в нашей стране, так как это — здоровье почвы и растений, а, в конечном счете, и здоровье человека.

Литература

1. Дереневский С.П., Кащи П.Э., Небельсин Г.П., Семенов А.И. Грядная технология вермикультивирования (производство биогумуса). — СПб.: Гидрометеиздат, 1994. — 232 с.
2. Конин С.С., Титов И.Н., Лавров В.В. Способ получения биогумуса. Патент РФ № 2255078 от 25.12.2002 г.
3. Морев Ю.Б. Искусственное разведение дождевых червей. Литературный обзор. — Фрунзе: ИЛИМ, 1990. — 62 с.
4. Нефедов Г.Н., Трувелер К.А. К экоремедиации через вермикомпостирование городских органических отходов / Материалы I Международной конференции «Дождевые черви и плодородие почв». Владимир, 21–23 ноября 2002 г. — Владимир, 2002. — С. 76–78.
5. Терещенко Н.Н. Способ полевого круглогодичного вермикультивирования. Патент РФ № 2204900 от 06.06.2001 г.
6. Титов И.Н. Дождевые черви. Руководство в 2-х частях. Часть I: Компостные черви. — М.: ООО «МФК «Точка Опоры», 2012. — 284 с.
7. Чичерин Г.М. Способ полевого вермикультивирования. Патент РФ № 2071255 от 29.11.1994 г.
8. Appelhof M. Worms Eat My Garbage. 2nd ed. — Kalamazoo, MI: Flower Press, 1977. — 163 p.
9. Barrett T.J. Earthworms. Their Propagation and Use in Biological Soil-Building. The Earthmaster System. — Earthmaster Publications. Roscoe, Calif., 1947. — 59 p.
10. Blakemore R.J.A. Series of Searchable Texts on Earthworm Biodiversity, Ecology and Systematics from Various Regions of the World. (Eds.: N. Kaneko & M.T. Ito). COE Soil Ecology Research Group. — Yokohama National University, Japan, 2005.
11. Bogdanov P. Commercial Vermiculture: How to Build a Thriving Business in Redworms. — Petros Publishing Company, 1999. — 83 p.
12. Edwards C.A. (ed.). Earthworm ecology, second edition. — CRC Press LLC, 2004.
13. Edwards C.A. A historical overview of vermicomposting // Biocycle. — 1995 June. — Vol. 36. — N 6. — P. 56–58.
14. Edwards C.A. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms / In: Earthworms in Waste and Environmental Management, ed. C.A. Edwards & E.F. Neuhauser. — SPB, Hague, Netherlands, 1988. — P. 21–31.
15. Edwards C.A. Low-Technology Vermicomposting Systems / In: Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management, ed. C.A. Edwards, N.Q. Arancon and R. Sherman. — CRS Press, Taylor and Francis Group, 2011. — P. 79–90.
16. Edwards C.A. Medium- and High-Technology Vermicomposting Systems / In: Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management, ed. C.A. Edwards, N.Q. Arancon and R. Sherman. — CRS Press, Taylor and Francis Group, 2011. — P. 91–102.
17. Edwards C.A. The use of earthworms in the breakdown and management of organic waste / In: Edwards C.A. (ed.), Earthworm Ecology. — St. Lucie Press, Boca Raton, FL, 1998.
18. Edwards C.A., Burrows I., Fletcher K.E., and Jones B.A. The use of earthworms for composting farm wastes / In: Composting of Agricultural and Other Wastes (ed. J.K.R. Gasser). — Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 1985. — P. 229–242.
19. Edwards C.A., Neuhauser E.F. Earthworms in Waste and Environmental Management. — SPB Academic Publishing, Hague, Netherlands, 1988.
20. Ferruzzi C. Manuale del Lombricoltura. — EDAGRICOLE. Bologna, Roma, Milano, 1983. — 121 p.
21. GEORG. Feasibility of Developing the Organic and Transitional Farm Market for Processing Municipal and Farm Organic Wastes Using Large-Scale Vermicomposting. — Good Earth Organic Resources Group, Halifax, Nova Scotia, 2004.
22. Holcombe D.R., Edwards C.A. Solids discharge device. Patent US 2002/0144658 A1. Oct. 10, 2002.
23. Munroe G. Manual of On-Farm Vermicomposting and Vermiculture. Organic Agriculture Centre of Canada. 2005. http://oacc.info/docs/vermiculture_farmersmanual_gm.pdf.
24. Sherman-Huntoon R. Latest developments in mid-to-large-scale vermicomposting // Biocycle. — 2000. — Vol. 41(11). — P. 51–54.
25. Sinha R.K., Valani D. Vermiculture Revolution. The Technological Revival of Charles Darwin's Unheralded Soldiers of Mankind. — Nova Science Publishers Inc., 2011.
26. Thomas K., Popert S., Blanden J., Oporto L. Use of a combined BOKASHI TM System and Vermicomposting to treat Food Waste from Educational Establishments / В сб.: Вермикомпостирование и вермикультивирование как основа экологического земледелия в XXI веке: проблемы, перспективы, достижения. Тр. Междун. науч.-практич. конф. Минск, 4–8 июня 2007 г. — Минск: УП Камет, 2007. — С. 83.
27. Windle H.N. High efficiency vermiculture process and apparatus. Patent US 6223687 B1. May 01, 2001.

VERMICULTURE: INNOVATIVE ENVIRONMENTAL TECHNOLOGIES OF RECYCLING OF DOMESTIC, AGRICULTURAL AND INDUSTRIAL ORGANIC WASTE

I.N. TITOV

Vladimir State University, Vladimir, Russia

The review deals with the current state of vermiculture in the world and prospects of implementation of this environmentally friendly biotechnological methods in Russia. The advantages and disadvantages of different technological approaches to the practical organization of production based on vermiculture were discussed.

Keywords: vermiculture, biotechnology.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2012 ГОДА

**Круглый стол
в Государственной Думе ФС РФ
«О совершенствовании законодательного
обеспечения развития биомедицинских клеточных
технологий в Российской Федерации»
(Москва, 26 апреля 2012 г.)**

26 апреля 2012 года в Москве, в Государственной Думе ФС РФ состоялся круглый стол «О совершенствовании законодательного обеспечения развития биомедицинских клеточных технологий в Российской Федерации». Организатор — Комитет Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям. В работе круглого стола приняли участие депутаты Государственной Думы, представители профильных министерств и ведомств, известные специалисты по обсуждаемой теме, эксперты, бизнес-структуры. По материалам данного мероприятия были приняты следующие РЕКОМЕНДАЦИИ.

Обсудив состояние и перспективы совершенствования законодательного обеспечения деятельности, связанной с медицинской биотехнологией и направленной на развитие новой индустрии биомедицинских клеточных продуктов, в том числе для регенеративной медицины, генно-клеточной терапии и тканевой инженерии в Российской Федерации, участники «круглого стола» в составе депутатов Государственной Думы, членов Совета Федерации, представителей федеральных органов исполнительной власти, исполнительных и законодательных органов власти субъектов Российской Федерации, органов местного самоуправления, руководителей научно-исследовательских учреждений, вузов, коммерческих и некоммерческих предприятий, общественных организаций, средств массовой информации отмечают.

В настоящее время в мире происходит формирование новой отрасли медицинской биотехнологии, основанной на создании препаратов для восстановления структуры и функции клеток, тканей и органов. Именно эта отрасль будет доминировать в научной и практической медицине в течение следующих десятилетий, ей надлежит дать методы терапии неизлечимых сегодня болезней человека.

Отличительной чертой современной медицины является ее «биологизация», широкое применение клеточных и молекулярных методов. Клеточные технологии, в том числе клеточная и тканевая инженерия, представляют собой новый подход, предполагающий использование

продуктов на основе выращенных вне организма или модифицированных клеток человека. Имеются обоснованные прогнозы, что клеточные технологии и тканевая инженерия изменят структуру современной медицины, приведут к формированию персонализированной медицины будущего, основанной на профилактическом принципе, что позволит обеспечить активное долголетие. Все это потребует создания новых и усовершенствования существующих социальных и правовых норм.

Важным достижением мировой биологической науки стала разработка методов получения любых клеток организма, включая половые, без использования эмбриональных клеток и тканей, что решает ряд принципиальных этических дилемм. Клеточные технологии и технологии тканевой инженерии могут уже в ближайшие 5-10 лет представить клинически приемлемые технологии восстановления жизненно важных тканей и органов: сердечной мышцы, печени, инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы, нервных клеток и др.

Более трех десятилетий активно функционируют национальные и международный регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток, включая клетки пуповинной крови. Ежегодно проводятся десятки тысяч трансплантаций с использованием отработанных клинических протоколов. В последнее время идет соответствующая работа по созданию регистра добровольных доноров и в Российской Федерации.

В странах Европы, США, Китае, Японии научно-технический прогресс и масштаб деятельности в области биомедицинских клеточных технологий опережают развитие других высокотехнологичных отраслей. Сюда активно инвестируются как государственные, так и частные средства. В ряде государств развитию стратегически значимых технологий уделяется особое внимание. В США работают более 500 компаний, а в Европе — свыше 400.

Мировой рынок биомедицинских клеточных технологий в настоящее время составляет 2,5 млрд. долларов США с прогнозируемым ростом к 2025 году до 15-30 млрд. долларов США.

Уже сегодня за рубежом ряд заболеваний успешно лечат продуктами клеточных технологий. Так, в технологически развитых странах резко снижена летальность от критических ожогов за счет широкого применения технологий выращивания клеток кожи и использования живого эквивалента кожи.

Клеточные продукты входят в практику лечения поражений рогаковицы, костного мозга, костей, хряща, ишемии конечностей. Ряд клеточных продуктов в разных странах проходит клинические испытания. Создается система банков тканей и органов на случай чрезвычайных ситуаций.

Участники «круглого стола» отметили, что исследования в области биомедицинских клеточных технологий и продуктов в России в целом отстают от мирового уровня: они соответствуют ему только в ряде ведущих научно-исследовательских учреждений и вузов. Однако эти работы не обеспечены нормативной базой и не имеют системной поддержки со стороны государства. Как следствие, клеточные технологии развиваются на средства неспециализированных инвесторов и в основном нацелены на коммерческую деятельность.

Большинство проблем в области биомедицины связано с отсутствием в Российской Федерации государственной стратегии, законодательной базы, правовых норм по разработке, экспертизе, регистрации и клиническому применению биомедицинских клеточных продуктов.

Все это во многом предопределяет нелегальное применение биомедицинских клеточных продуктов и использование незарегистрированных, с недоказанной клинической эффективностью и биобезопасностью клеточных продуктов и технологий.

В отсутствие законодательного регулирования инвесторы не заинтересованы в создании соответствующей инфраструктуры, системы биобезопасности, формирования доказательной базы клинической эффективности и безопасности.

Однако до сегодняшнего дня в мире не сложилось универсальной и единственно возможной системы нормативного регулирования безопасности, эффективности и контроля качества клеточных продуктов, которая могла бы быть без изменений заимствована для Российской Федерации.

В течение трех лет Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации ведется разработка проекта федерального закона «Об обращении биомедицинских клеточных продуктов». В настоящее время Минздравсоцразвития России подготовлен проект федерального закона, основные положения которого поддерживаются научным сообществом, и принятие которого должно ликвидировать имеющийся правовой вакуум в части обеспечения эффективности и безопасности биомедицинских клеточных продуктов, поступающих на рынок.

В то же время, для формирования равномерного правового регулирования требуется разработка проекта федерального закона, который регулировал бы вопросы биомедицинского применения тканей человека.

Исследования, направленные на решение социально значимых медицинских проблем, выполняемые на достаточном научно-методическом уровне, не могут найти поддержки из-за отсутствия целевых программ и специальных фондов. В результате не проводится профессиональная экспертиза проектов, нет здоровой конкурентной среды и образцов успешно выполненных исследований в области клеточных технологий.

Развитие клеточных технологий сдерживается в России отсутствием достаточного числа специалистов, имеющих соответствующую подготовку в этой области. Нет системы обучения и сертификации специалистов по разработке, контролю и использованию клеточных продуктов. В связи с этим развиваются крайне простые технологические подходы, повторяются результаты, уже ставшие рутинными для мирового сообщества.

Участники «круглого стола» отметили, что рынок биомедицинских клеточных продуктов требует, чтобы клеточные продукты в учреждения здравоохранения поступали только с лицензированных производств, созданных на основе требований GMP, с обеспечением всех требований нормативной документации и контроля качества на всех стадиях технологического процесса.

Участники «круглого стола» согласились, что вопросы организации экспертизы биомедицинских клеточных продуктов в ходе их государственной регистрации имеют первостепенное значение для становления новой отрасли медицины.

Так как при разработке и производстве клеточных продуктов будут использованы самые разные научно-методические подходы и принципы, система экспертизы клеточного продукта и его компонентов потребует не только разработки, но и постоянного научного развития и обоснования при участии специалистов научно-исследовательских учреждений и вузов.

Необходимы координированные усилия государственных органов и профессионального сообщества для развития клеточных технологий и технологий тканевой инженерии в Российской Федерации. Недостаточная активность в данной стратегически важной области может привести к отставанию и затормозит решение приоритетных медико-социальных вопросов.

Таким образом, решение вышеуказанных проблем требует принятия комплексных мер государственного регулирования, включая законодательных, для обеспечения

разработки, экспертизы, регистрации и внедрения биомедицинских клеточных продуктов в практику оказания медицинской помощи в Российской Федерации.

В целях обеспечения развития биомедицинских клеточных технологий в Российской Федерации участники «круглого стола» рекомендуют:

1. Государственной Думе, Совету Федерации Федерального Собрания Российской Федерации:

1.1. Усовершенствовать законодательную базу в сфере применения биомедицинских клеточных технологий и тканевой инженерии с учетом накопленного зарубежного опыта.

2. Правительству Российской Федерации:

2.1. Ускорить внесение в Государственную Думу Федерального Собрания Российской Федерации проекта федерального закона «Об обращении биомедицинских клеточных продуктов в Российской Федерации».

2.2. Разработать государственную целевую программу развития клеточных технологий и тканевой инженерии в Российской Федерации, предусмотрев в ней приоритетную поддержку следующих направлений:

- обеспечение приоритетного финансирования разработки и испытаний биомедицинских клеточных продуктов;
- создание благоприятных условий для функционирования современных производств биомедицинских клеточных продуктов, включая налоговые преференции;
- усовершенствование таможенного регулирования при передаче биоматериалов для производства биомедицинских клеточных продуктов;
- создание в масштабах страны системы банков клеток и тканей в соответствии с потребностями здравоохранения, включая обеспечение медицины катастроф.

2.3. Сформировать межведомственную группу из профильных специалистов различных министерств и ведомств, в том числе Минздравсоцразвития России, Минобрнауки России, Минпромторга России, РАН, РАМН, а также представителей общественных и религиозных организаций, с целью обсуждения вопросов координации научно-исследовательских и практических работ, создания производств, подготовки кадров, этических аспектов в области биомедицинских клеточных технологий и тканевой инженерии.

2.4. Поручить Минздравсоцразвития России:

- разработать пакет законодательных и нормативно-правовых актов, регулирующих правоотношения, связанные с биомедицинским применением тканей

человека, включая вопросы функционирования банков клеток и тканей, способствующих внедрению биомедицинских клеточных технологий и технологий тканевой инженерии, в том числе трансплантации и использования гемопоэтических стволовых клеток, на федеральном и региональном уровнях.

3. Органам государственной власти субъектов Российской Федерации:

3.1. Обеспечить нормативно-правовую, организационную и экономическую поддержку учреждениям и организациям, осуществляющим деятельность в сфере биомедицинских клеточных технологий и тканевой инженерии.

Председатель Комитета Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям В.А. Черешнев.

ПУБЛИКАЦИИ

Титов И.Н. Дождевые черви. Руководство по вермиккультуре в двух частях. Часть I: Компостные черви. — М.: ООО «МФК Точка Опоры», 2012. — 284 с.: ил.

Аннотация. Предлагаемая книга является наиболее полным практическим руководством по вермиккультуре, или искусственному разведению дождевых (компостных) червей или олигохет в контролируемых условиях, и написана с учетом последних научных и практических достижений в этой области. В Части I руководства содержится научная и практическая информация о биологии дождевых червей, их роли и месте в экосистемах, о различных видах дождевых червей, обитающих в почве. Описаны способы культивирования компостных червей и вермикомпостирования различных органических отходов и технологии промышленного вермикомпостирования и выращивания компостных червей в домашних условиях для садоводов, огородников, фермеров и рыболовов. В Части II руководства описываются различные виды вермипродукции, методы получения органических удобрений, почвогрунтов и биопрепаратов на основе вермикомпостов, их применение в органическом земледелии для выращивания широкого ряда сельскохозяйственных культур: овощных и зерновых, а также декоративных и комнатных растений. Показаны перспективы развития этого направления для экологизации сельского хозяй-

ства. Отдельная глава посвящена фармацевтической ценности дождевых червей.

Паршиков И.А. Методы биотехнологии в синтезе лекарств. — Уфа: Издательство «Инфинити», 2012. — 108 с.

Аннотация. Монография посвящена методам биотехнологии. В работе описаны примеры применения микробных технологий для получения производных противомаларийных лекарств из ряда азотистых гетероциклов (азааренов, хинолонов, насыщенных азотистых гетероциклов) и терпеноидов. Предлагается поиск альтернативных путей синтеза веществ, которые трудно получить с помощью методов органической химии. Микробные технологии синтеза органических соединений могут найти свое практическое применение в получении различных лекарственных

средств. Для научных сотрудников, работающих в области биотехнологии, микробиологии и фармакологии.

Сатарова Т.Н. Биотехнология кукурузы: итоги и перспективы. — Днепропетровск: Украинский государственный химико-технологический университет, 2011. — 26 с.

Резюме. Рассматривается биотехнология кукурузы как важной сельскохозяйственной культуры. Описывается получение гаплоидов в культуре пыльников для ускоренного создания гомозиготных линий, каллусогенез и регенерация в культуре незрелых зародышей, фундаментальные исследования в условиях *in vitro* у кукурузы, основные исходные эксплантаты в исследованиях «в пробирке» *in vitro* у кукурузы, андрогенез, эмбриогенез, каллусогенез и др.

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

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные 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 27.06.12
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. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

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

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

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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