

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск), В.Т. Иванов (Москва),
Л.В. Калакуцкий (Пушино), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва), Н. Раевский (Берлин, Германия),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрыбин (Москва), Р.М. Хаитов (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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 4

Оригинальные статьи

Сравнительная оценка биодоступности наночастиц и ионов меди для мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (*Bivalvia: Mytilidae*) в условиях лабораторного эксперимента.

Ю.И. Фадеева, В.Я. Кавун, В.В. Слободскова, В.П. Челомин 5

Сточные воды как источник электричества в микробных топливных элементах.

А.Я. Ягофарова, А.А. Курманбаев, К.Т. Бердимуратов, И.А. Ахметоллаев 10

Рост, состояние фотосинтетического аппарата и ультраструктура микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) при высоком загрязнении медью.

Ж.В. Маркина, А.Ю. Попик 16

Влияние нонилфенола на цианобактерию *Microcystis aeruginosa* в различных окислительно-восстановительных условиях среды.

Ю.М. Поляк, В.И. Сухаревич 23

Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europa* на метаболизм клетки.

Э.С. Хашимова, К.А. Кахарова, Е.О. Терентьева, Н.Ж. Сагдиев 29

Краткие сообщения

Исследование природы дисперсных светящихся частиц раковых клеток.

М.С. Абдуллаходжаева, А.Р. Фаттахов, Э.С. Хашимова, К.А. Кахарова, Н.Ж. Сагдиев 34

Биотехнологическое образование в университетах Москвы.

Е.А. Гладков 37

Обзоры

Микробиологическое получение препаратов органических кислот в качестве средств защиты растений.

И.Г. Моргунов, Э.Г. Дедюхина, С.В. Камзолова, Т.И. Чистякова, Ю.Н. Лунина, А.А. Миронов, Н.Н. Степанова, О.Н. Шемшур, М.Б. Вайнштейн 41

Страницы истории

Юбилейные и знаменательные даты 2016 года 53

К 100-летию со дня рождения В.Д. Беляева — организатора микробиологической промышленности СССР 53

К 10-летию со дня смерти академика РАН А.А. Воробьева (1923—2006) 60

Правила для авторов 62

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Comparative assessment of bioavailability of nanoparticles and ions copper for the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (*Bivalvia: Mytilidae*) under laboratory conditions.

Yu.I. Fadeeva, V.Ya. Kavun, V.V. Slobodskova, V.P. Chelomin 5

Wastewater as a source of electricity in microbial fuel cells.

A.Ya. Yagofarova, A.A. Kurmanbaev, K.T. Berdimuratov, I.A. Ahmetollaev 10

Growth, state of the photosynthetic apparatus and the ultrastructure of microalga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) with a high copper pollution.

Zh.V. Markina, A.Yu. Popik 16

Influence of nonylphenol on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in different redox environments.

Yu.M. Polyak, V.I. Sukharevich 23

The action of lectin-like proteins of *Cuscuta europea* on cell metabolism.

Z.S. Hashimova, K.A. Kaharova, E.O. Terentyeva, N.J. Sagdiev 29

Short communications

Study of the nature of dispersed luminescent particles of cancer cells.

M.S. Abdullahodzhaeva, A.R. Fattahov, Z.S. Hashimova, K.A. Kaharova, N.J. Sagdiev 34

Biotechnology education at the universities of Moscow.

E.A. Gladkov 37

Reviews

Microbiological production of preparations based on organic acids as plant protection products.

I.G. Morgunov, E.G. Dedyukhina, S.V. Kamzolova, T.I. Chistyakova, Ju.N. Lunina, A.A. Mironov, N.N. Stepanova, O.N. Shemshura, M.B. Weinstein 41

Pages of history

Anniversary and significant dates 2016. 53

On the 100th anniversary of the birth of V.D. Belyaev – organizer of microbiological industry of the USSR. 53

By the 10th anniversary of the death of academician A.A. Vorobyev (1923–2006)..... 60

Rules for authors 62

К читателям

В третьем номере журнала за 2016 год имеются работы, объединенные общей тематикой и выполненные в одном учреждении. Так, сотрудники Института биологии моря им. А.В. Жирмунского (Владивосток) представили результаты двух исследований. В одном из них проведена сравнительная оценка биодоступности наночастиц и ионов меди для мидии Грея в условиях лабораторного эксперимента (Фадеева Ю.И. с соавт.). В другой работе Маркина Ж.В. и Попик А.Ю. изучали рост, состояние фотосинтетического аппарата и ультраструктуру микроводоросли *Heterosigma akashiwo* при высоком загрязнении медью.

Группа сотрудников из Национального центра биотехнологии (Астана, Казахстан) — Ягофарова А.Я. с коллегами — выполнила исследование, в котором ставилась задача использовать сточные воды как источник электричества в микробных биотопливных элементах. Показано, что культура *Enterobacter Ps7* проявляет наибольшую электрогенную активность.

Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. из Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности РАН исследовали влияние нонилфенола на цианобактерию *Microcystis aeruginosa* в различных окислительно-восстановительных условиях среды. Выявлены существенные изменения в процессах роста, фотосинтеза и образования цианотоксинов *M. aeruginosa* под действием поллютанта.

В работе Э.С. Хашимовой и соавт. (Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, Ташкент, Республика Узбекистан) изучено действие лектиноподобных белков *Cuscuta europea* на метаболизм клетки.

В рубрике «Краткие сообщения» помещены две статьи: «Исследование природы дисперсных светящихся частиц раковых клеток» (Абдуллаходжаева М.С. и др., Ташкент, Республика Узбекистан) и «Биотехнологическое образование в университетах Москвы» (Гладков Е.А., Москва).

В обзоре Моргунова И.Г., Дедюхиной Э.Г., Камзоловой С.В. и др. (Пушино и Алма-Ата) рассмотрены и обобщены данные об использовании органических кислот в качестве средств защиты растений.

В разделе «Страницы истории» представлены материалы к 100-летию со дня рождения В.Д. Беляева — организатора микробиологической промышленности СССР. На конкретных примерах показано, как было организовано ускоренное решение важнейшей государственной задачи по обеспечению продовольственной безопасности страны за счет внедрения биотехнологии. Редколлекцией также подготовлена подборка к 10-летию со дня смерти академика РАМН А.А. Воробьева (1923–2006), первого президента Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова.

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИДОСТУПНОСТИ НАНОЧАСТИЦ И ИОНОВ МЕДИ ДЛЯ МИДИИ ГРЕЯ *CRENOMYTILUS GRAYANUS* (DUNKER, 1853) (BIVALVIA: MYTILIDAE) В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Ю.И. ФАДЕЕВА*, В.Я. КАВУН, В.В. СЛОБОДСКОВА, В.П. ЧЕЛОМИН

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Владивосток

Широкое применение наночастицы (НЧ) CuO в современной промышленности неизбежно приводит к их попаданию в водную среду и, как следствие, к взаимодействию с живыми организмами. Из-за малых размеров наночастицы могут не распознаваться защитными системами, не подвергаться биотрансформации и не выводиться из организма. Данные свойства НЧ металлов могут привести к их накоплению в биосфере и передаче по пищевой цепи. Достаточная изученность токсичности ионов меди (Cu^{2+}) для морских организмов позволяет использовать эти данные для сравнения с действием НЧ, информация о котором весьма противоречива и нуждается в дальнейшем исследовании. Нами проведена сравнительная оценка биодоступности наночастиц CuO (20 мкг/л) и ионов Cu^{2+} (12 мкг/л) в жабрах, пищеварительной железе (ПЖ) и почках мидии Грея в условиях лабораторного эксперимента. Эксперимент длился в течение 60 сут с разделением на два этапа: 30 сут острое воздействие и 30 сут — стадия очистки. Полученные результаты свидетельствуют о низкой биодоступности использованных нами НЧ меди для мидии Грея. В эксперименте с Cu^{2+} отмечено резкое накопление меди в жабрах и почках при относительно стабильном содержании в ПЖ на этапе острого эксперимента. У моллюсков этой группы выявлено эффективное выведение меди из всех трех органов после снятия токсической нагрузки. Высказано предположение о значительном влиянии стресса, вызванного долговременной изоляцией при ежедневной замене воды в аквариумах, на биодоступность меди в исследованных органах моллюсков.

Ключевые слова: наночастицы CuO , *Crenomytilus grayanus*, жабры, пищеварительная железа, почки.

Введение

В последнее десятилетие итогом техногенного развития человечества стало все более широкое применение еще одной формы металлов в виде наночастиц (НЧ, частицы размером между 1 и 100 нм). Поверхностные свойства и очень маленькие размеры НЧ металлов обеспечивают им комплекс физических, химических и биологических свойств, которые часто радикально отличаются от свойств этих же элементов в ионной форме. Среди таких особенностей выделяют увеличение их адсорбционной емкости, химической реакционной способности и каталитических свойств в связи с высокой удельной поверхностью наноматериалов. Из-за малых размеров

наночастицы могут не распознаваться защитными системами, не подвергаться биотрансформации и не выводиться из организма. Данные свойства НЧ металлов могут привести к их накоплению в биосфере и передаче по пищевой цепи [9, 15, 16].

Несмотря на то, что принято противопоставлять токсичность НЧ и ионов меди, отметим, что НЧ металлов при определенных условиях могут стать источниками ионов [13]. Также, помимо частичного перехода CuO в Cu^{2+} в жидкостях, НЧ, как и ионы, могут быть причиной образования активных радикалов, развития окислительного стресса [14], окисления липидов и повреждения ДНК [7].

Двустворчатые моллюски благодаря способности отфильтровывать большие объемы воды и аккумулировать в своих органах различные поллютанты широко используются в экотоксикологических исследованиях [10]. Проблему воздействия наночастиц, в частности оксида меди, на морских двустворчатых моллюсков на протяжении последних пяти лет на примере *Mytilus galloprovincialis* изучает Гомес с соавторами [13, 14].

В целом к настоящему времени накоплено мало информации о том, что происходит с НЧ металлов при

© 2016 г. Фадеева Ю.И., Кавун В.Я., Слободскова В.В., Челомин В.П.

* Автор для переписки:

Фадеева Юлия Игоревна

аспирантка лаборатории физиологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

E-mail: Fadeeva-imb@mai.ru

попадании в водную среду, а также об их биоаккумуляции в органах и тканях морских организмов, особенно при хроническом воздействии. Имеющиеся сведения о токсичном воздействии НЧ металлов на морские организмы противоречивы и нуждаются в дальнейшем изучении [9].

Цель настоящей работы состояла в сравнении биодоступности НЧ CuO (наноформа, 20 мкг/л) и ионов Cu (ионная форма, 12 мкг/л) в жабрах, пищеварительной железе (ПЖ) и почках *Crenomytilus grayanus* в условиях лабораторного эксперимента.

Материалы и методы

Объектом исследования послужил двустворчатый моллюск *Crenomytilus grayanus*, который широко используется как в лабораторных, так и в полевых исследованиях, связанных с биоаккумуляцией тяжелых металлов [11, 17], хлорорганических пестицидов [1] и радионуклидов [19], а также при изучении механизмов токсического действия комплексного загрязнения [2, 4, 6, 8].

Для эксперимента были отобраны моллюски *Crenomytilus grayanus* примерно равного размера ($13,18 \pm 0,62$ см), обитающие в акватории острова Рейнеке, которая является фоновым районом [5, 18]. Исходную группу мидий выдерживали в аквариуме с ежедневной заменой воды из фонового района в течение двух дней после отбора. Затем часть моллюсков препарировали и извлекали жабры, ПЖ и почки. Другую часть моллюсков помещали на 7 сут в аквариумы с морской водой для акклиматизации при постоянной температуре и аэрации. После мидий пересаживали в 100-литровые аквариумы, наполненные морской водой из аквариальной установки Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН из расчета 1 экз. на 2 л: 46 экз. контрольной группы помещали в аквариум с чистой водой, а по 44 экз. — в два аквариума с НЧ CuO (20 мкг/л) и CuSO₄ (12 мкг/л). В целом эксперимент длился 60 сут. В течение первых 30 сут в аквариум с экспериментальными моллюсками вносили растворы НЧ CuO и CuSO₄. Для подготовки рабочих растворов в 100 мл дистиллированной воды растворяли 0,0125 г порошка CuO (<50 нм, 29 м²/г, «Sigma-Aldrich») и 0,0251 г медного купороса (CuSO₄·5H₂O). Перед каждым внесением в аквариум растворы перемешивали на ультразвуковой бане (44 кГц) в течение 20 мин. В течение вторых 30 сут длился период очистки.

В ходе эксперимента каждые 10 сут отбирали по 5 мидий из каждого аквариума. Мидий препарировали, выделяя жабры, ПЖ и почки.

Воду в аквариумах меняли через каждые 24 ч. В ходе эксперимента измеряли соленость, температуру и рН (табл. 1). Также определяли содержание Cu в воде в районе сбора моллюсков (остров Рейнеке, $0,19 \pm 0,05$ мкг/л) и в месте водозабора для аквариальной установки ($0,36 \pm 0,07$ мкг/л). Мидий во время эксперимента не кормили, смертность животных не зарегистрирована.

Таблица 1

Контролируемые параметры воды в экспериментальных аквариумах

Температура, °С	Соленость, ‰	рН
17±1	32,11±1,1	7,97±0,32

Исследуемые органы высушивали при 85 °С и минерализовали концентрированной HNO₃ марки ОСЧ. Концентрацию металлов определяли методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии на приборах Shimadzu-6800F и Shimadzu-6800G. Контроль качества определений включал в себя измерение концентраций металлов в используемых кислотах, дубликатах проб и сертифицированных образцах моллюсков (NBS SRM 1566a и ERM-CE278k). Среднее отклонение от паспортных данных стандартных образцов составляло для Cu 5%. Средние значения концентраций металла и стандартное отклонение определяли с помощью пакета программ Excel. Достоверность различий между выборками определяли по критерию Манна — Уитни с использованием пакета программ Statistica.

Результаты и обсуждение

В жабрах контрольной группы мидий концентрация меди после достоверного снижения на 10-е сут была стабильна до завершения эксперимента. В ПЖ достоверные изменения содержания этого металла были отмечены на 30- и 40-е сут, повышение с последующим его снижением, соответственно. В почках концентрация меди оставалась неизменной в течение всего эксперимента (рис. 1). У мидий из аквариума с ионной формой меди содержание этого металла в жабрах и почках существенно возросло на 10-е сут эксперимента (в 2 и 3 раза, соответственно). На 30-е сут достоверное повышение концентрации Cu в жабрах было не скомпенсировано его выведением почками, что привело к достоверному повышению уровня содержания меди в ПЖ. В период очистки концентрация металла достоверно снизилась в трех органах: в жабрах и ПЖ — на 40- и 50-е сут, в почках — с 40-х по 60-е сут (см. рис. 1).

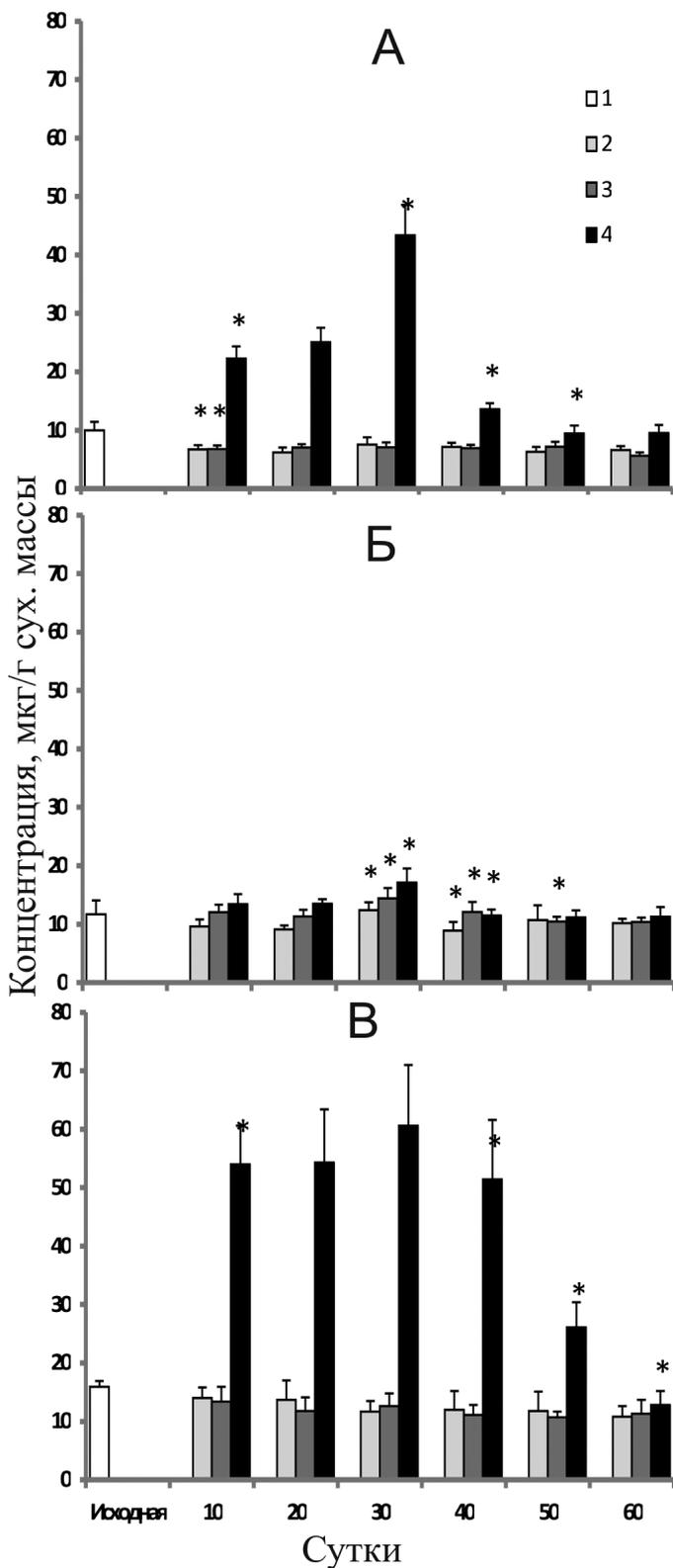


Рис 1. Динамика изменения концентрации Cu в органах *Crenomytilus grayanus*: А – жабры, Б – пищеварительная железа, В – почки; 1 – исходная, 2 – контроль, 3 – ионная форма, 4 – наночастица; * звездочкой обозначены достоверные различия концентраций в каждой отдельной исследованной группе

Достоверные изменения содержания Cu в органах моллюсков из аквариума с НЧ были такие же, как в контрольной группе на протяжении всего эксперимента (см. рис. 1).

Ранее проведенный эксперимент по пересаживанию моллюсков в сильно загрязненный биотоп (с повышенным содержанием биодоступной меди) позволил проследить защитную стратегию мидий Грея, которая направлена на временную изоляцию от неблагоприятных воздействий среды [6]. В нашем эксперименте подобная защитная реакция наблюдалась и у мидий, подверженных воздействию ионной формы металла. Очевидно, в условиях повышенного содержания ионной меди в среде активность работы почек возросла уже на 10-е сут эксперимента, что позволяло сдерживать накопление Cu в ПЖ. Концентрация меди, используемая в лабораторном эксперименте, в 2,4 раза превышала ее содержание в среде в натурном эксперименте, но такое различие концентраций не приводило к большему накоплению этого металла в органах экспериментальной группы моллюсков [3]. Данное явление, вероятно, обусловлено стрессом, стимулировавшим временную изоляцию мидий в ответ на ежедневную смену воды в аквариумах. Эта изоляция, очевидно, приводила к прекращению поступления токсиканта в организм моллюсков в указанный период, что понижало биодоступность исследуемых форм металла в эксперименте.

Введение на протяжении 30 сут двух форм меди в аквариумы с мидиями позволило сравнить их биодоступность. Сопоставление динамики микроэлементного состава в органах моллюсков из аквариума с НЧ CuO и из контрольной группы свидетельствует об отсутствии существенного накопления этой формы меди в исследуемых органах. Такое явление может быть связано с рядом причин, например, с низкой биодоступностью, обусловленной свойствами НЧ меди. Известно также, что НЧ CuO в морской воде образуют агрегации, которые, в свою очередь, могут выпадать в осадок. Часть частиц и их агрегаций, вероятно, сорбируются слизью на поверхности жабр моллюсков, что затрудняет их проникновение в организм. В то же время для ионов меди выделение клеточной слизи не является столь существенным барьером [12, 20]. Стоит отметить, что при препарировании моллюсков органы были тщательно промыты дистиллированной водой и большая часть слизи с НЧ меди могла быть удалена с их поверхности. Наряду с этим степень накопления НЧ может зависеть от специфично-видовой защитной стратегии моллюсков, используемых в экспериментах. Для сравнения: ранее

полученные результаты [13] показали, что при меньшем содержании CuO в экспериментальной среде (10 мкг/л) медь в ПЖ моллюска вида *Mytilus galloprovincialis* аккумулировалась в течение всего 15-суточного эксперимента и достигала концентрации 28 мкг/г сухой массы. В то же время в нашем эксперименте содержание этого металла, как и в контроле, достоверно увеличилось только на 30-е сут исследования и составило 14 мкг/г сухой массы.

Заключение

Из полученных результатов можно сделать вывод, что отсутствие существенного накопления меди в органах моллюсков *Crenomytilus grayanus* из аквариума с НЧ определяется низкой биодоступностью исследованной нами формы металла.

В настоящее время механизмы завуалированного проявления биологической активности (токсичности) наночастиц неясны, хотя важность исследований в этом направлении не вызывает сомнений, если учитывать огромные масштабы производства и поступления наночастиц в биосферу. Для того чтобы в полной мере прояснить и оценить значение выявленных в нашей работе изменений в метаболизме меди, необходимы дальнейшие углубленные исследования.

На таком низком фоне изменения меди в исследованных органах моллюсков, подверженных воздействию НЧ CuO , нами выявлены значительные изменения в микроэлементном обмене.

Литература

1. Боярова М.Д. Современные уровни содержания хлорорганических пестицидов в водных организмах залива Петра Великого (Японское море) и озера Ханка: дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2008. — 130 с.
2. Довженко Н.В., Кавун В.Я., Бельчева Н.Н., Челомин В.П. Биохимические показатели окислительного стресса как индикаторы антропогенного загрязнения водных экосистем / Океанологические исследования: Сб. статей по материалам конф. молодых ученых ТОИ им. В.И. Ильичева ДВО РАН, 27–30 ноября 2001 г. — Владивосток: Дальнаука, 2002. — С. 290–296.
3. Кавун В.Я., Шулькин В.М. Изменение микроэлементного состава органов и тканей двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* при акклиматизации в биотопе, хроническом загрязненном тяжелыми металлами // Биология моря. — 2005. — Т. 31. — № 2. — С. 123–128.
4. Ковалев Н.Н., Кавун В.Я., Костецкий Э.Я., Михеев Е.В., Подгурская О.В. Холинэстеразная активность гемолимфы мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae), обитающей в импактных природных и антропогенных условиях // Биология моря. — 2016. — Т. 42. — № 1. — С. 41–47.
5. Ковековдова Л.Т., Симоконь М.В. Тенденции изменения химико-экологической ситуации в прибрежных акваториях Приморья. Токсичные элементы в донных отложениях и гидробионтах // Изв. ТИНРО. — 2004. — Т. 137. — С. 310–320.
6. Подгурская О.В., Кавун В.Я. Оценка адаптационно-защитного потенциала двустворчатых моллюсков *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) и *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) в условиях повышенного содержания тяжелых металлов в среде // Биология моря. — 2012. — Т. 38. — № 2. — С. 174–182.
7. Ahamed M., Siddiqui M.A., Akhtar M.J., Ahmad I., Pant A.B., Alhadlaq H.A. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2010. — Vol. 396. — P. 578–583.
8. Belcheva N.N., Zakhartsev M.V., Dovzhenko N.V., Zhukovskaya A.F., Kavun V.Ya., Chelomin V.P. Anthropogenic pollution stimulates oxidative stress in soft tissues of mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Ocean Sci. J. — 2011. — Vol. 46. — No. 2. — P. 85–94.
9. Bhatt I., Tripathi B.N. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment // Chemosphere. — 2011. — Vol. 82. — No. 3. — P. 308–317.
10. Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gallo C. Bivalve molluscs as a unique target group for nanotoxicity // Mar. Environ. Res. — 2012. — Vol. 76. — P. 16–21.
11. Chusuei Ch.C., Wu Ch., Mallavarap Sh., Hou F.Y., Hsu Ch., Winiarz J.G., Aronstam R.S., Huang Yu. Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties // Chem. Biol. Interact. — 2013. — Vol. 206. — P. 319–326.
12. Gomes T., Araujo O., Pereira R., Almeida A.C., Cravo A., Bebianno M.J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Environ. Res. — 2013. — Vol. 84. — P. 51–59.
13. Gomes T., Pereira C.G., Cardoso C., Pinheiro J.P., Cancio I., Bebianno M.J. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* // Aquat. Toxicol. — 2012. — Vol. 118–119. — P. 72–79.
14. Gomes T., Pinheiro J.P., Cancio I., Pereira C.G., Cardoso C., Bebianno M.J. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Environ. Sci. Technol. — 2011. — Vol. 45. — No. 21. — P. 9356–9362.
15. Moore M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // Environ. Int. — 2006. — Vol. 32. — P. 967–976.

16. Scown T.M., Aerle R.V., Tyler C.R. Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2010. – Vol. 40. – No. 7. – P. 653–670.
17. Shulkin V.M., Kavun V.Ya. The use of marine bivalves in heavy metal monitoring near Vladivostok, Russia // *Mar. Pollut. Bull.* – 1995. – Vol. 31. – P. 330–333.
18. Shulkin V.M., Presley B.J., Kavun V.Ya. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments // *Environ. Int.* – 2003. – Vol. 29. – No. 4. – P. 493–502.
19. Tkalin A.V., Lishavskaya T.S., Shulkin V.M. Radionuclides and trace metals in mussels and bottom sediments around Vladivostok, Russia // *Mar. Pollut. Bull.* – 1998. – Vol. 36. – P. 551–554.
20. Ward J.E., Kach D.J. Marine aggregate facilitate the ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves // *Mar. Environ. Res.* – 2009. – Vol. 68. – P. 137–142.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF BIOAVAILABILITY OF NANOPARTICLES AND IONS COPPER FOR THE GRAY MUSSEL CRENOMYTILUS GRAYANUS (DUNKER, 1853) (BIVALVIA: MYTILIDAE) UNDER LABORATORY CONDITIONS

Yu.I. FADEEVA, V.Ya. KAVUN, V.V. SLOBODSKOVA, V.P. CHELOMIN

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Vladivostok

Broad application of nanoparticles (CuO NPs) in modern industry inevitably leads to their introduction into the water and as a result, to interaction with living organisms. Because of their small size the nanoparticles can not be recognized by protective systems, can not be undergone to biotransformation and can not be excreted from the body. These properties of the metal NP can lead to their accumulation in the biosphere and the transfer of the food chain. Sufficient study of copper ions (Cu²⁺) toxicity for marine organisms gave an opportunity to use these data to compare with the effect of CuO NPs, information about which is very controversial and needs further study. We carried out a comparative assessment of the bioavailability CuO nanoparticles (20 mkg/l) and Cu²⁺ (12 mkg/l) in gills, digestive gland and kidneys of a mussel in laboratory conditions. Experiment lasted for 60 days with division into two stages: 30 days – acute exposure and 30 days – purification. The results demonstrated low bioavailability CuO NPs which we used for the mussels. In experiment with Cu²⁺ it was demonstrated a rapid accumulation of copper in the gills and kidneys and relatively stable content of copper in the digestive gland during acute experiment. In this group of molluscs it was detected an effective elimination copper from all three bodies after removing the toxic load. It is suggested a significant effect of stress caused by long-term isolation in daily replacement of water in tanks on copper bioavailability in molluscs investigated organs.

Keywords: nanoparticles CuO, *Crenomytilus grayanus*, gills, digestive gland, kidney.

СТОЧНЫЕ ВОДЫ КАК ИСТОЧНИК ЭЛЕКТРИЧЕСТВА В МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

А.Я. ЯГОФАРОВА*, А.А. КУРМАНБАЕВ, К.Т. БЕРДИМУРАТОВ, И.А. АХМЕТОЛЛАЕВ

РГП «Национальный центр биотехнологии», Астана, Казахстан

В работе рассматривается получение электрического тока при одновременном разложении илов городских муниципальных вод. Микробная топливная ячейка состоит из двух пластиковых герметично закрытых контейнеров — камер, соединенных солевым мостиком. В анодную часть помещали графитовый анод и заполняли камеру илами городских сточных вод, отобранных на станции очистки ГКП «Астана Су Арнасы». Основные параметры ячейки измеряли в течение 9 сут. Установлено, что максимальные напряжение 270 мкВ и силу тока 8,8 мкА наблюдали на 5-е сут. Проводилась также работа по изучению электрогенных свойств чистых культур *Bacillus amylofaciens* U15, *Enterobacter* Ps7, *Lactobacillus fermentum* ТВ4. Показано, что культура *Enterobacter* Ps7 проявляет наибольшую электрогенную активность. Выполнялись исследования по испытанию однокамерной ячейки топливного элемента с воздушным катодом. Обнаружили, что максимальная мощность данной ячейки составляет 395 мВ. Для увеличения вырабатываемого напряжения был собран блок топливных элементов, в котором последовательно соединили восемь топливных ячеек. Было найдено, что максимальное напряжение составило 2,6 В, сила тока — 30,0 мкА. Максимальная мощность электрического тока составила 78,0 мкВт.

Ключевые слова: микробный топливный элемент, утилизация органических веществ, электричество, электрогенные бактерии.

Введение

Концепция устойчивого развития требует снижения зависимости от ископаемого топлива и уменьшения количества загрязнений, поступающих при сжигании топлива в окружающую среду. Современные методы производства энергии неустойчивы, вызывают изменения климата и глобальное потепление, что требует разработки новых методов производства энергии с использованием возобновляемых и углерод нейтральных источников.

В этой связи возникает неослабевающий интерес к развитию альтернативной энергетики, в частности, биоэнергетики. Одна из первых работ по генерации электроэнергии бактериями опубликована в 1911 году М. Potter [8]. Сегодня микробные топливные элементы (МТЭ) привлекают все больше внимания, за последние 15 лет

напечатано 90% публикаций по этой теме. МТЭ представляют собой потенциальное решение энергетических потребностей за счет возобновляемых и экологически чистых источников энергии.

МТЭ с протонпроницаемой мембраной разрабатывался в рамках космической программы НАСА в 1960-х годах. Однако падение производительности со временем, высокая стоимость, недостаточная долговечность, а также проблемы, касающиеся образования водорода и его хранения, препятствовали крупномасштабной коммерциализации этого устройства. В последние несколько десятилетий была проведена большая работа, чтобы повысить производительность каталитических слоев, мембранных материалов и других компонентов. Примечательно, что эти улучшения сопровождались одновременным снижением стоимости и повышением долговечности, способствовавшим переводу биотопливных элементов из лабораторий и на рынок [5].

Особый интерес МТЭ привлекают в связи с возможностью утилизации органических отходов с одновременной выработкой электричества. Отходы сельского хозяйства, деревоперерабатывающей промышленности, пищевые и другие могут обеспечивать энергией потребителей в населенных пунктах, сельскохозяйственных и промышленных зонах за счет небольших установок по переработке. Это позволит решить проблему из-

© 2016 г. Ягофарова А.Я., Курманбаев А.А., Бердимуратов К.Т., Ахметоллаев И.А.

* Автор для переписки:

Ягофарова Альмира Ядкарвна

магистр химии, научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК

Казахстан, г.Астана, Кургальджинское шоссе, 13/5

E-mail: almirayagy@mail.ru

быточного накопления органических отходов и снизить зависимость потребителей от традиционных источников энергии.

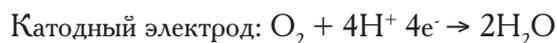
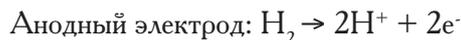
По определению, топливный элемент — это электрохимическое устройство, в котором химическая энергия топлива без его сжигания превращается в электрическую энергию. Поэтому в системе топливных элементов химическая энергия, связанная с электрохимической реакцией субстрата с окислителем, прямо переводится в воду, электроэнергию и тепло [6].

Движущая сила МТЭ — это окислительно-восстановительные реакции обычного клеточного метаболизма. Однако для получения тока на электродах необходимо вынести заряд из клеток. Данная задача решается с помощью медиаторов, которые при входе в клетку окисляют клеточные кофакторы. Выходя из клетки, медиаторы переносят заряд на электрод, а кофактор остается в клетке. При этом медиатор может быть ковалентно связан с анодом, а клетки могут свободно перемещаться вблизи анода. Клетки могут быть ковалентно связаны с электродом, а медиатор находится между анодом и клетками. Медиатор может быть адсорбирован на поверхности клеток, передавая электроны при контакте клеток с электродом. Медиаторы необходимы в анодной части МТЭ.

В МТЭ может быть использован широкий круг бактерий, но предпочтение отдается анаэробным микроорганизмам, поскольку примерно 90% их метаболизма представляют собой катаболические процессы; поэтому прирост биомассы минимален по сравнению с аэробными процессами [2].

На сегодняшний день предложено несколько конструкций МТЭ, наиболее отработанной является модель с использованием протон-проницаемых мембран (ППМ). Имеются двухкамерные и однокамерные стандартные модели. Однако ППМ является ахиллесовой пятой МТЭ. Они дороги и подвергаются быстрому обрастанию биопленками микроорганизмов, что отрицательно сказывается на производительности ТЭ. Ниже показана схема устройства МТЭ и принцип его работы.

Для подпитки ТЭ используются субстраты, такие как H_2 , метанол, этанол, и т.д. Отсюда реакции, происходящие в топливном элементе, можно описать следующим образом. Водород на анодном электроде изменяется в ион водорода и высвобождаются электроны. Эти электроны движутся через внешнюю цепь (контур) к катоду и производят электрический ток. Анодные и катодные реакции в МТЭ происходят с образованием газа H_2 на аноде по следующей схеме:



В МТЭ бактерии отделены от конечного акцептора электронов на катоде, так что единственным средством для дыхания является перенос электронов на анод. Типичный микробный топливный элемент состоит из анодных и катодных камер (рис. 1).

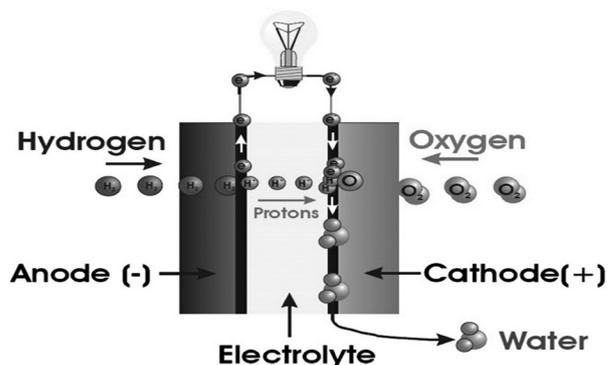
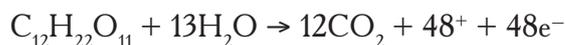


Рис.1. Схема устройства МТЭ и принцип его работы

В анодном отсеке топливо окисляется микроорганизмами, генерируя электроны и протоны. Электроны передаются в катодное отделение через внешнюю электрическую цепь, а протоны переносятся через мембрану в катодную камеру. Электроны и протоны расходуются в катодном отделении и в сочетании с кислородом образуют воду. В общем, могут быть два типа микробных топливных ячеек: ячейки с медиатором и ячейки без медиатора. Микроорганизмы обладают способностью производить электрохимически активные вещества, которые могут быть либо метаболическими посредниками или конечными продуктами анаэробного дыхания. Если микроорганизмы потребляют субстрат, такой как сахар, в аэробных условиях они производят углекислый газ и воду. Однако, когда кислород отсутствует, они производят двуокись углерода, протоны и электроны [4].



Клетки после этого делаются способными использовать неорганические медиаторы для включения в электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) клеток и принять образующиеся электроны. Медиатор пересекает внешние клеточные липидные мембраны и плазматическую стенку, и затем они начинают освобождать электроны из ЭТЦ, которые обычно поглощаются кислородом и другими посредниками. Восстановленный медиатор выходит из клетки нагруженным электронами, которые он переносит на электрод и где он отдает их. Этот электрод становится

электрогенерирующим анодом. Освобождение электронов означает, что медиатор вернулся к своей исходной окисленной форме и готов повторить процесс. Важно подметить, что это происходит только в анаэробных условиях. Иначе кислород как более электроотрицательный по сравнению с медиатором соберет на себя все электроны. В качестве медиаторов используется ряд соединений, такие как метиленовый синий, нейтральный красный, тионин, гуминовые кислоты и т.д. [3].

В безмедиаторных ТЭ используются электрохимически активные бактерии, способные непосредственно к передаче электронов с цитохромов, расположенных на внешней мембране, на электрод [7].

Преимуществами топливных элементов по сравнению с другими типами устройств, которые производят энергию, являются:

- более высокая эффективность;
- отсутствие подвижных частей и, как следствие, отсутствие звукового загрязнения;
- нет выбросов экологически загрязняющих газов, таких как SO_x , NO_x , CO_2 , CO , и т.д.

Следовательно, МТЭ являются объектом современных интенсивных исследований в области биоэнергетики. Интерес к ним поддерживается из-за их способности производить энергию из возобновляемых источников, таких как отходы сточных вод, и других подобных источников. Ныне топливные элементы находятся на грани широких революционных изменений в области электричества. Поэтому исследования в данном направлении являются очень актуальными.

Материалы и методы

Микробная топливная ячейка состоит из двух пластиковых герметично закрытых контейнеров — камер, соединенных солевым мостиком.

В анодную камеру помещали графитовый анод и заполняли камеру илами городских сточных вод, отобранных на станции очистки ГКП «Астана Су Арнасы»; крышку камеры плотно закрывали, создавая анаэробные условия. Дополнительно прибавляли медиатор — раствор метиленового синего для обеспечения эффективного электронного транспорта от бактериальных метаболитов к аноду.

Во вторую камеру помещали графитовый катод и заполняли камеру 3%-ным раствором $NaNO_3$ (х.ч.). Камеры были соединены солевым мостиком. Для приготовления солевого мостика предварительно растворяли 15 г $NaNO_3$ (х.ч.) и 3 г агара в 150 мл деионизированной воды (деионизатор Sartorius 810A).

Результаты и обсуждение

На рисунке 2 представлена микробная топливная ячейка, собранная в лаборатории экологической биотехнологии.

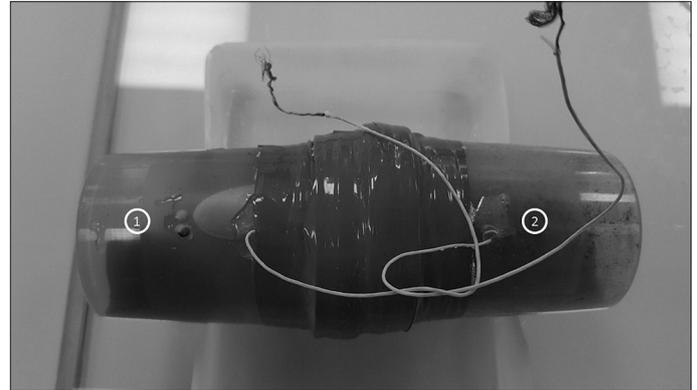


Рис. 2. Микробная топливная ячейка. 1 — катодная камера, 2 — анодная камера

Параметры МТЭ, такие как напряжение и сила тока, замеряли ежедневно в определенное время в течение 9 дней.

Результаты изменения напряжения представлены в таблице 1.

Таблица 1

Изменения напряжения (мкВ) в микробной топливной ячейке

Параметры	Дни								
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й
Напряжение, В	0,1	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,6	0,6	0,4
Сила тока, мА	0,01	0,01	0,10	0,20	0,40	0,50	0,70	0,70	0,04

Из таблицы 1 видно, что напряжение в микробной топливной ячейке нарастает с 0,1 до 0,5 В в течение 6 дней. Максимум 0,6 В наблюдали на седьмой день, затем напряжение снизилось до 0,4 В на 9-й день. Аналогичная тенденция изменения наблюдалась в случае силы тока.

Исходя из полученных данных, были вычислены параметры мощности электрического тока в мВ. Результаты представлены на рисунке 3.

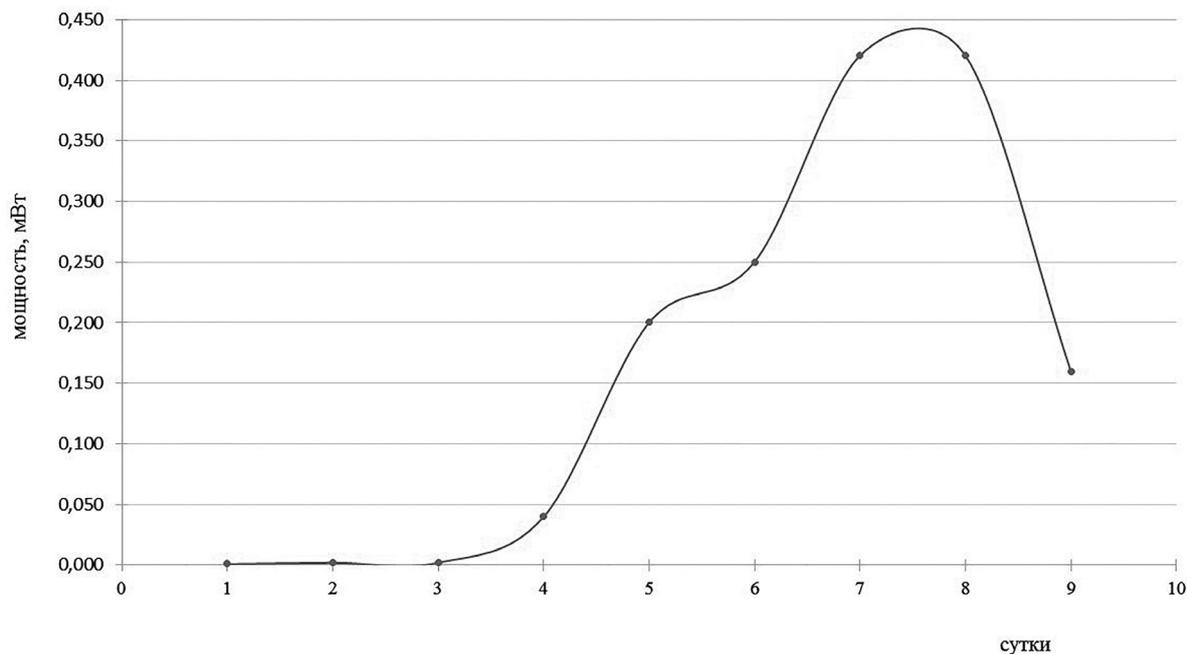


Рис. 3. Изменения мощности (мВт) в микробной топливной ячейке

На рисунке 3 видно, что значения мощности нарастают в первые 6 дней с 0,001 мВт до 0,25 мВт, достигают максимума 0,42 мВт на 7–8-е сутки, на 9-е сутки значения мощности снижаются до 0,2 мВт.

Далее проводилась работа по изучению электрогенных свойств чистых культур *Bacillus amylofaciens* U15, *Enterobacter* Ps7, *Lactobacillus fermentum* ТВ4. Для этого в анодную часть микробной топливной ячейки помещали искусственно приготовленную минеральную среду: 2 г NaCH_3COO (х.ч.), 4,4 г KH_2PO_4 (х.ч.), 3,4 г K_2HPO_4 (х.ч.), 1,5 г NH_4Cl (х.ч.), 0,1 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), 0,1 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), 0,1 г KCl (х.ч.), 0,1 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), 0,005 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), 0,001 г $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.) и бактериальную массу соответствующей культуры. Изменения напряжения и силы тока в ячейке замеряли каждый день в течение 7 дней. Результаты представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что культура *Enterobacter* Ps7 проявляет наибольшую электрогенную активность. Напряжение в случае использования данной культуры растет с 460 мкВ в первый день, что выше примерно на 10–15% по сравнению с остальными культурами, до максимума 505 мкВ на 4-й день, что превышает значения максимального напряжения в случае *Bacillus amylofaciens* U15 и *Lactobacillus fermentum* ТВ4 примерно на 40%. Затем на 5–7-й дни напряжение падает во всех случаях до 200 мкВ.

Для улучшения продуктивности и уменьшения затрат и расходных материалов была собрана однокамерная микробная топливная ячейка с воздушным катодом. Воздушный катод был изготовлен согласно предложенной схеме в работе [1]. На рисунке 4 представлена схема однокамерной микробной топливной ячейки с воздушным катодом и графитовым анодом.

Таблица 2

Изменения напряжения (мкВ) в микробной топливной ячейке, с добавлением различных культур

Название культур	Дни						
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й
<i>Bacillus amylofaciens</i> U15	318	314	342	345	386	350	286
<i>Enterobacter</i> Ps7	460	413	401	505	280	276	203
<i>Lactobacillus fermentum</i> ТВ4	390	368	386	390	340	266	201

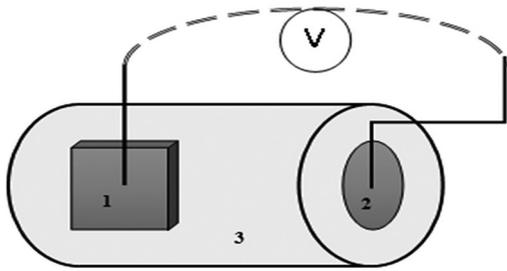


Рис. 4. Схема однокамерной микробной топливной ячейки с воздушным катодом. 1 – анод, 2 – воздушный катод, 3 – ячейка с активным илом

Основные параметры ячейки снимали в течение семи дней. Результаты представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что значения напряжения возрастают с 155 до 350 мВ за первые четыре дня, максимальное напряжение 395 мВ наблюдали на 5–6-й день, затем в течение трех дней значения снижались с 186 до 142 мВ. В изменении силы тока наблюдалась такая же тенденция. Максимальное значение силы тока составило 20 мкА на 6-е сутки.

Для увеличения вырабатываемого напряжения был собран блок топливных элементов, в котором последовательно соединили восемь топливных ячеек (рис. 5).

Параметры блока МТЭ замерыли в период с 30.11.2015 г. по 11.12.2015 г. Результаты измерения напряжения и силы тока представлены в таблице 4.



Рис. 5. Блок топливных элементов

Из таблицы 4 видно, что напряжение и сила тока увеличиваются с 0,5 В и 0,1 мкА (30.11.2015 г.) до максимальных 2,6 В и 30,0 мкА (08.12.2015 г.), соответственно; затем в течение последующих дней значения параметров снижались до 1,8 В и 14 мкА. Максимальная мощность электрического тока составила 78,0 мкВт.

Таблица 3

Изменения основных параметров однокамерного МТЭ

Параметры	Дни								
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й
Напряжение, мВ	155,0	180,0	240,0	350,0	395,0	395,0	186,0	180,0	142,0
Сила тока, мкА	1,3	1,6	5,7	13,2	18,0	20,0	19,0	4,9	2,8

Таблица 4

Изменения основных параметров в блоке МТЭ

Параметры	Даты 2015 года								
	30.11	02.12	03.12	04.12	07.12	08.12	09.12	10.12	11.12
Напряжение, В	0,5	0,8	1,3	1,5	1,8	2,6	2,6	2,4	1,8
Сила тока, мкА	0,1	26,0	22,0	26,3	22,0	30,0	28,8	25,0	14,0
Мощность электрического тока, мкВт	0,5	20,8	27,5	31,0	39,6	78,0	74,9	60,0	25,2

Заключение

Таким образом, в работе была показана возможность получения электрического тока при одновременном разложении илов городских муниципальных вод. Данное направление биоэнергетики нуждается в дальнейшем развитии и раскрытии его потенциала на территории Республики Казахстан.

Литература

1. Патент США. 1995. US5378562 А.
2. Федорович В.В., Мажитов Т.О., Калюжный С.В. Биотопливные элементы — новые возможности для энергетики // Катализ в промышленности. — 2004. — № 1. — С. 29–34.
3. Bennetto H.P., Stirling J.L., Tanaka K. and Vega C.A. Anodic reaction in microbial fuel cells // Biotechnology and Bioengineering. — 1983. — Vol. 25. — P. 559–568.
4. Bennetto H.P. Electricity generation by microorganisms // Biotechnology Education. — 1990. — Vol. 1. — No.4. — P. 163–168.
5. Fuel Cell Today. The Fuel Cell Industry Review 2012. Available online: <http://www.fuelcelltoday.com/analysis/industry-review/2012/the-industry-review-2012>. Accessed: 08.10.2013.
6. Logan B.E. and Regan J.M. Microbial fuel cells challenges and applications // Environmental Science and Technology. — 2006. — Vol. 40. — P. 5172–5180.
7. Muralidharan et al. Impact of salt concentration on electricity production in microbial hydrogen based salt bridge fuel cells // Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. — 2011. — Vol. 1(2). — P. 178–184.
8. Potter M. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds // Proc. R. Soc. Lond. — 1911. — Vol. 84. — P. 260–276.

WASTEWATER AS A SOURCE OF ELECTRICITY IN MICROBIAL FUEL CELLS

A. Ya. YAGOFAROVA, A.A. KURMANBAEV, K.T. BERDIMURATOV, I.A. AHMETOLLAEV

National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

The paper deals with obtaining an electric current while the decomposition of urban municipal sludge was carried out. The microbial fuel cell consists of two plastic hermetically sealed containers — chambers connected saline bridge. The graphite anode was placed in the anode part, the anode chamber was filled with silt and municipal wastewater, collected on Public utility company «Astana Su Arnasy» treatment plant. Main parameters measured in the cell for 9 days. It was found that the maximum voltage of 270 μV and current of 8.8 μA was observed on the 5th day. Work was also realised to study electrogenic properties of pure cultures of *Bacillus amylofaciens* U15, *Enterobacter* Ps7, *Lactobacillus fermentum* TB4. It was shown that the culture of *Enterobacter* Ps7 shows the greatest electrogenic activity. The single-chamber fuel cell with air cathode was tested. It was demonstrated that the maximum power of the cell is 395 μV . To increase the generated voltage was assembled a unit of fuel cells in which the eight fuel cells were connected successively. It was found that the maximum voltage reached 2.6 V, the current — 30.0 μA . The maximum capacity of the electric power was 78.0 μW .

Keywords: microbial fuel cell, recycling of organic substances, electricity, electrogenic bacteria.

РОСТ, СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА И УЛЬТРАСТРУКТУРА МИКРОВОДОРОСЛИ *HETEROSIGMA AKASHIWO* (*RAPHYDORHYNCEAE*) ПРИ ВЫСОКОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ МЕДЬЮ

Ж.В. МАРКИНА^{1*}, А.Ю. ПОПИК²

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН,

² Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, Владивосток

Исследовано действие меди в концентрации 100 мкг/л на рост, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов, лазерно-индуцированную флуоресценцию (ЛИФ) хлорофилла *a* и ультраструктуру рафидофитовой водоросли *Heterosigma akashiwo*. Численность клеток, содержание фотосинтетических пигментов и показатели ЛИФ уменьшались через 1 сутки эксперимента. В последующие дни опыта оцениваемые параметры возрастали, однако были существенно ниже таковых в контроле. Ультраструктура водоросли в среде с медью изменялась: количество вакуолей и митохондрий увеличивалось. Большинство митохондрий было повреждено. Выраженных ультраструктурных изменений фотосинтетического аппарата не обнаружено.

Ключевые слова: медь, загрязнение, микроводоросли, *Heterosigma akashiwo*.

Введение

Рафидофитовая водоросль *Heterosigma akashiwo* широко распространена в прибрежных водах субарктических и умеренных широт Южного и Северного полушарий. В настоящее время увеличивается количество случаев красных приливов, вызываемых данной микроводорослью. Ее массовое размножение приводит к гибели рыб и беспозвоночных, что причиняет вред окружающей среде и наносит экономический ущерб [9, 13, 21]. В связи с этим ведутся активные исследования данной микроводоросли [10, 15, 20].

Среди огромного количества экологических факторов, действующих на растения, особого внимания заслуживает медь. В низких концентрациях она — жизненно необходимый элемент для растительных организмов, тогда как при высоком содержании в среде приводит к нарушению физиолого-биохимических процессов, повреждению клеточных структур и, в итоге, гибели организма [3, 7]. Вследствие интенсивной антропогенной деятельности увеличивается поступление загрязняющих веществ в воды Мирового океана, поэтому медь представляет собой один из приоритетных токсикантов для

исследований как в природной среде, так и в лабораторных условиях. ПДК меди в морской воде составляет 5 мкг/л, в то же время ее концентрации в морской воде в районах портов России могут достигать до 100 мкг/л [2].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании роста, функционирования фотосинтетического аппарата и ультраструктуры *Heterosigma akashiwo* при интоксикации медью.

Материалы и методы

Объектом исследования служила одноклеточная рафидофитовая водоросль *Heterosigma akashiwo* (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara & M. Chihara, 1987, выделенная Н.А. Айздайчер из залива Золотой Рог Японского моря. Водоросль выращивали на среде *f* [6], приготовленной на основе стерилизованной морской воды соленостью 32‰ при температуре 20 °С, интенсивности освещения 70 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ в области видимого света и свето-темновым периодом 12 ч свет : 12 ч темнота.

Медь добавляли в виде CuSO₄·4H₂O в день постановки опыта, концентрация меди составляла 100 мкг/л.

Количество клеток водорослей подсчитывали в счетной камере Горяева под микроскопом Zeiss Primo Star.

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли стандартным методом экстракции из клеток ацетоном с последующим измерением на спектрофотометре Shimadzu-UV 2550. Расчет концентраций данных пигментов и пигментного индекса проводили по известным формулам [1].

© 2016 г. Маркина Ж.В., Попик А.Ю.

* Автор для переписки:

Маркина Жанна Васильевна,
кандидат биологических наук,
690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17.
E-mail: zhannav@mail.ru

Возбуждение лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) хлорофилла *a* осуществлялось диодным лазером с непрерывным излучением с длиной волны 445 нм мощностью 38 мВт. Спектры ЛИФ микроводоросли измерялись спектрометром Shamrock 303i компании Andor Technology (США) с EMCCD камерой Newton 970. Интенсивность ЛИФ нормировали на коэффициент рассеяния воды.

Для электронно-микроскопического анализа клетки фиксировали в течение 2 ч в 2,5% глутаральдегиде, приготовленном на фосфатном буфере (рН 7,4), а затем в 1%-ном растворе четырехоксида осмия на том же буфере в течение 1 ч. Для повышения контрастности было использовано окрашивание клеток 0,15% раствором рутения красного в течение 15 мин. Затем материал обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ацетона и заливали в смесь смол Epon и Araldit (Fluka, Швейцария). Срезы толщиной 70 нм изготавливали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Ultracut RLEICA (Австрия) и контрастировали 2% раство-

ром уранилацетата и цитратом свинца по стандартной методике Рейнольдса [18]. Срезы исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) Libra 200 (Carl Zeiss, Германия).

Все опыты проводили в трех повторностях. В таблицах представлены средние значения и стандартные отклонения.

Результаты

Численность клеток *Heterosigma akashiwo* в контроле увеличивалась на протяжении всего опыта, особенно интенсивно через четверо суток, что подтверждается высокой скоростью роста и наименьшим временем генерации в этот период (табл. 1). При добавлении меди в среду количество клеток уменьшалось через 1 сутки, а в последующие дни оно незначительно возрастало и к завершению опыта было меньше контрольного в три раза (см. табл. 1). Скорость роста при данных условиях была низкой, а время генерации существенно увеличивалось.

Таблица 1

Действие меди на рост популяции микроводоросли *Heterosigma akashiwo*

Показатель	Сутки	Концентрация меди	
		Контроль	100 мкг/л
Численность клеток $\times 10^4$ в мл	0	3,5 \pm 0,00	3,5 \pm 0,00
	1	4,3 \pm 0,97	2,7 \pm 0,90
	4	12,5 \pm 2,70	4,6 \pm 1,03
	7	18,8 \pm 0,94	6,4 \pm 1,37
Скорость роста, делений/сут	1	0,19	0
	4	0,35	0,18
	7	0,13	0,11
Время генерации, ч	1	85,7	0
	4	46,3	92,1
	7	123,1	148,3

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в контроле увеличивалось в течение экспозиции и коррелировало с численностью клеток (табл. 2). При внесении меди содержание хлорофилла *a* оставалось на одном уровне в течение эксперимента. Содержание каротиноидов при интоксикации медью снижалось через 1 сутки опыта, а к четвертым суткам возрастало, но было существенно ниже такового в контроле (см. табл. 2). Пигментный индекс водоросли при воздействии меди через сутки был ниже

контрольного и значительно превышал его через четверо суток (см. табл. 2).

ЛИФ хлорофилла *a* снижалась сразу после внесения меди, однако через 1 сутки не отличалась от контрольной. В последующие дни данный показатель был в 1,7 раза ниже при воздействии токсиканта, чем в чистой среде (см. табл. 2).

В контроле наблюдались клетки *H. akashiwo* вытянутой овальной формы, размером около 10–14 мкм с

двумя жгутиками, множеством хлоропластов золотистого цвета, расположенных пристеночно (рис. 1, А). В центре клетки расположено округлое ядро около 4 мкм в диаметре, рядом находится аппарат Гольджи и множество

митохондрий (рис. 1, Б). Единственный пиреноид лежит внутри каждого хлоропласта. Внутреннее содержимое пиреноида мелкогранулированное, несколько ламелл могут проходить сквозь него (рис. 1, В).

Таблица 2

**Действие меди на содержание фотосинтетических пигментов
и показатели лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ)
хлорофилла *a* микроводоросли *Heterosigma akashiwo***

Показатель	Сутки	Концентрация меди	
		Контроль	100 мкг/л
Содержание хлорофилла <i>a</i> , мкг/л	0	255±16,1	255±16,1
	1	332±4,1	262±14,2
	4	1145±43,6	257±38,7
	7	1836±294,0	239±50,5
Содержание каротиноидов, мкг/л	0	243±13,0	243±13,0
	1	271±5,1	191±3,9
	4	837±37,9	220±34,6
	7	1473±262,7	242±57,2
Пигментный индекс	0	2,32	2,32
	1	2,20	2,13
	4	2,42	2,55
	7	2,19	2,46
Интенсивность ЛИФ хлорофилла <i>a</i> на длине волны (682 нм)	0	44,1±2,1	26,7±7,1
	1	55,7±24,1	54,2±3,99
	4	121,2±13,4	70,8±5,6
	7	145,7±11,9	85,6±34,5

Также в стромах хлоропластов располагаются так называемые глазки («eyespot»), или пластоглобулы, представляющие собой небольшие скопления светочувствительных пигментов (рис. 1, В, указаны стрелкой). Хлоропласты содержат множество ламелл, каждая из которых состоит из 2 тилакоидов (рис. 1, Г). Ламеллы располагаются вдоль всей длины хлоропласта, практически параллельно его оси. Митохондрии клеток *H. akashiwo* вытянутой овальной формы с тубулярными кристами. Их размеры колеблются в диапазоне от 0,5 до 1 мкм (рис. 1, Д). Аппарат Гольджи стандартно представлен стопкой уплощенных цистерн с отделяющимися от них пузырьками (см. рис. 1, Д).

При воздействии меди в концентрации 100 мкг/л клетки приобретают более вытянутую форму (рис. 1, Е).

На изученных электроннограммах клетки *H. akashiwo* сильно вакуолизированы, особенно в периферической части (рис. 1, Ж). Значительные изменения фотосинтетического аппарата нами не выявлены. В некоторых хлоропластах увеличивалось интратилакоидное пространство, тилакоиды дистанцировались друг от друга (см. рис. 1, Ж), однако большинство хлоропластов в изученных клетках не отличалось от нормы (рис. 1, З, И). Наибольшие изменения претерпевали митохондрии (рис. 1, К). Их внутреннее содержимое выглядело практически полностью разрушенным, вдоль внутренней мембраны было заметно небольшое количество крист или их остатки. Кроме того, визуально размер этих органелл значительно больше, чем в контроле. Остальные органеллы выглядели без изменений.

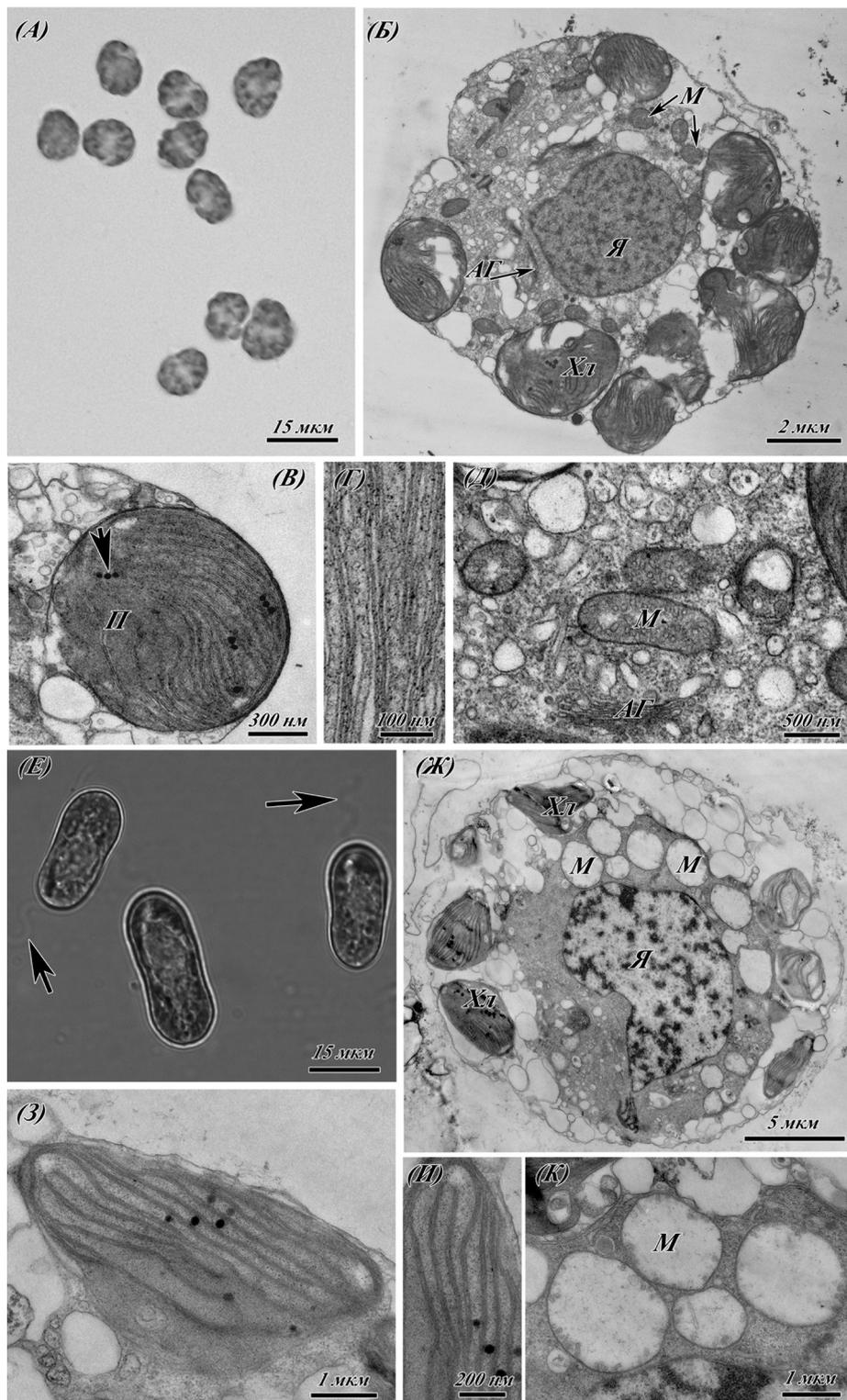


Рис. 1. Воздействие меди в концентрации 100 мкг/л на ультраструктуру клеток *Heterosigma akashiwo*: (А–Д) – контроль. (А) – общий вид клетки без воздействия меди, световая микроскопия; (Б) – общий вид клетки, ТЭМ: Я – ядро, М – митохондрии (указаны стрелками), Хл – хлоропласты, АГ – аппарат Гольджи; (В) – строение хлоропласта: П – пиреноид (стрелкой указана группа светочувствительных глазков); (Г) – строение тилакоидов; (Д) – строение митохондрий и аппарата Гольджи: М – митохондрии, АГ – аппарат Гольджи. (Е–Ж) – 100 мкг/л. (Е) – общий вид клеток *Heterosigma akashiwo* после воздействия меди, световая микроскопия; (Ж) – общий вид клетки, ТЭМ: Я – ядро, Хл – хлоропласты. (З–К) – электронно-микроскопическая организация органоидов в эксперименте. (З) – состояние ультраструктуры хлоропласта (в пределах нормы); (И) – строение тилакоидов (близкое к норме); (К) – деструктивная реакция митохондрий. *Примечание:* структуры в (А) и (Е) окрашены в желтый цвет. Масштаб приведен на фотографиях

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что медь в концентрации 100 мкг/л оказывала влияние как на рост, так и на функционирование фотосинтетического аппарата *Heterosigma akashiwo*. Основное повреждающее действие меди обусловлено продуцированием активных форм кислорода, вследствие ее участия в реакциях Фентона и Хабер – Вейса [3, 8]. Известно, что большая часть активных форм кислорода продуцируется в хлоропластах, а также в митохондриях, пероксисомах и клеточной стенке [19]. В связи с этим фотосинтетический аппарат и митохондрии наиболее уязвимы к действию факторов среды. Главной ролью хлоропластов является осуществление процесса фотосинтеза, но они также участвуют в синтезе аминокислот, жирных кислот и иммунном ответе растений; следовательно, если фотосинтетический аппарат подвергается негативному воздействию, то рост водорослей неизбежно изменяется [3]. В нашем опыте под действием меди это происходило уже в начале эксперимента. У диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* при 100 мкг/л рост водоросли также тормозился в течение четырех суток, однако флуоресценция хлорофилла *a* увеличивалась [4].

Снижение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов под действием меди могло происходить как за счет выхода белков и липидов из мембран тилакоидов, приводящего к повреждению светособирающего комплекса и фотосистемы II, так и вследствие ингибирования ферментов, вовлеченных в синтез пигментов [8, 22]. У красной макроводоросли *Gracilaria domingensis* при содержании меди 5 мкг/л отмечены такие же изменения: уменьшение содержания фотосинтетических пигментов, флуоресценции хлорофилла *a* [5].

Более высокий пигментный индекс при 100 мкг/л меди свидетельствует о вкладе каротиноидов в защиту клетки *H. akashiwo* от меди, однако так происходит не у всех водорослей: например, у *Chlamidomonas reinhardtii* в сходных условиях каротиноиды не накапливались [16].

В нашем эксперименте при содержании 100 мкг/л меди интенсивность ЛИФ была ниже таковой в контроле. Известно, что медь играет важную роль в электронном транспорте фотосистем, так как содержащий ее пластоцианин переносит электроны из цитохромного *b6f*-комплекса к реакционному центру фотосистемы I [11]. В результате ее избыток приводит к изменению потока электронов в электрон-транспортной цепи. Кроме того, Cu^{2+} способна заменять Mg^{2+} в молекуле хлорофилла *a*, делая его непригодным для фотосинтеза, вследствие

меньшей стабильности в возбужденном состоянии и слабой способности удерживаться в порфириновом кольце. Сбрасываемая энергия от таких поврежденных хлорофиллов может передаваться молекулярному кислороду, приводя к появлению синглетного кислорода, вызывающего окислительное повреждение [17], и, возможно, это является одной из причин снижения содержания хлорофилла *a* и ЛИФ. Параллельно эти явления сопровождаются рассеиванием энергии в виде тепла, тем самым еще более усиливая повреждение фотосинтетического аппарата [3].

Ультраструктура клетки *H. akashiwo* при воздействии меди претерпевала изменения. В то же время, как показано ранее [3], у *Chlorella vulgaris* ультраструктурные изменения отмечены при концентрациях от 64 мкг/л. Наибольшие изменения у *H. akashiwo* при добавлении токсиканта отмечены в митохондриях: их количество увеличивалось; кроме того, многие из них были повреждены. Размер, численность и субклеточное распределение данных органоидов могут изменяться в зависимости от физиологических потребностей клеток и вследствие действия токсикантов. Как показано на *Pseudokirhiella subcapitata*, клеточные мембраны митохондрий сильнее подвержены влиянию меди, чем других металлов даже в больших концентрациях. Под действием меди изменяется электрохимический протонный градиент, необходимый для продукции АТФ. Медь, проникая через мембраны митохондрий, уменьшает разницу зарядов на внешней и внутренней стороне мембраны, приводя к ингибированию дыхания [14]. У *H. akashiwo* при 100 мкг/л меди в наших экспериментах отмечено появление большого количества вакуолей. Неоднократно показано использование вакуолей для депонирования и последующей детоксикации тяжелых металлов [7, 8, 22]. Известно, что медь может накапливаться в тилакоидах [12], однако в проведенных нами опытах такого факта не наблюдалось.

Заключение

Таким образом, медь в концентрации 100 мкг/л вызывала торможение роста *Heterosigma akashiwo*. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в токсической среде снижалось, ЛИФ хлорофилла *a* также была меньше контрольной. Изменялась ультраструктура клеток: отмечено появление большого количества вакуолей, увеличение числа митохондрий. В то же время существенного изменения фотосинтетического аппарата не происходило.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-00257 «Особенности влияния меди на физиологию и ультраструктуру морских микроводорослей из разных таксономических групп».

Литература

1. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла *a* // Гос. стандарт СССР. Гос. ком. СССР по охране природы. — М.: Изд-во стандартов, 1990. — 15 с.
2. Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2012 / Под ред. Коршенко А.Н. — М.: Наука, 2013. — 200 с.
3. Chen Z., Song S., Wen Yu., Zou Yu., Liu H. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress // *Environ. Sci. Pollut. Res.* — 2016. — Vol. 23(18). — P. 17910–17918. — doi:10.1007/s11356-016-6997-2.
4. Cid A., Fidalgo P., Herrero C., Abalde J. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry // *Cytometry.* — 1996. — Vol. 25. — P. 32–36.
5. Gouveia C., Kreuzsch M., Schmidt E. S., de L. Felix M. R., Osorio L. K. P. et al. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis* // *Microsc. Microanal.* — 2013. — Vol. 19. — P. 513–524.
6. Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // *Can. J. Microbiol.* — 1962. — Vol. 8. — P. 229–239.
7. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exper. Bot.* — 2002. — Vol. 53. — P. 1–11.
8. Hossain M.A., Piyatida P., Teixeira da Silva J. A., Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation // *Journal of Botany.* — 2012. — Vol. 2012. — Article ID 872875. — 37 pages. doi: 10.1155/2012/872875.
9. Kempton J., Keppler Ch. J., Lewitus A., Shuler A., Wilde S. A novel *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom extending from a South Carolina bay to offshore waters // *Harmful Algae.* — 2008. — Vol. 7. — P. 35–40.
10. Kim M.-C., Yoshinaga I., Imai I., Nagasaki K., Itakura S. et al. A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* — 1998. — Vol. — 170. — P. 25–32.
11. Küpper H., Küpper F.C., Spiller M. [Heavy metal]-chlorophylls formed in vivo during heavy metal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plant material // *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls.* — Springer, 2006. — P. 67–77.
12. Levy J., Stauber J. L., Jolley D.F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity // *Sci. Tot. Envir.* — 2007. — Vol. 387. — P. 141–154.
13. Li D., Cong W., Zh. Cai, Shi D., Ouyang F. Response of growth and photosynthesis of marine red tide alga *Heterosigma akashiwo* to iron and iron stress condition // *Biotechnol. Lett.* — 2002. — Vol. 24. — P. 743–747.
14. Machado M.D., Soares E.V. Use of a fluorescence-based approach to assess short-term responses of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to metal stress // *J. Appl. Phycol.* — 2015. — Vol. 27. — P. 805–813.
15. Martínez R., Orive E., Laza-Martínez A., Seoane S. Growth response of six strains of *Heterosigma akashiwo* to varying temperature, salinity and irradiance conditions // *J. Plankton. Res.* — 2010. — Vol. 32. — P. 529–538.
16. Nowicka B., Pluciński B., Kuczyńska P., Kruk J. Physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to chronic stress induced by Ag, Cd, Cr, Cu and Hg ions // *Ecotoxicol. Envir. Safety.* — 2016. — Vol. 130. — P. 133–145.
17. Pinto E., Sigaud-Kutner T., Leitao M. A., Okamoto O. K., Morse D. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae // *J. Phycol.* — 2003. — Vol. 39. — P. 1008–1018.
18. Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* — 1963. — Vol. 17. — P. 208–212.
19. Schmitt F.-J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S. K. et al. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2014. — Vol. 1837(6). — P. 835–848.
20. Shikata T., Nagasoe S., Matsubara T., Yoshikawa S., Yamasaki Ya. et al. Factors influencing the initiation of blooms of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* and the diatom *Skeletonema costatum* in a port in Japan // *Limnol. Oceanogr.* — 2008b. — Vol. 53. — P. 2503–2518.
21. Shikata T., Yoshikawa S., Matsubara T., Tanoue W., Yamasaki Ya. et al. Growth dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Hakata Bay, Japan // *Eur. J. Phycol.* — 2008a. — Vol. 43. — P. 395–411.
22. Yruela I. Copper in plants // *Braz. J. Plant. Physiol.* — 2005. — Vol. 17. — P. 145–156.

**GROWTH, STATE OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS
AND THE ULTRASTRUCTURE OF MICROALGA HETEROSIGMA AKASHIWO
(RAPHYDOPHYCEAE) WITH A HIGH COPPER POLLUTION**

Zh.V. MARKINA¹, A.Yu. POPIK²

¹*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology,
Far East Branch, Russian Academy of Sciences,*

²*Institute of Automation and Control Processes, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok*

The influence of the copper in concentration 100 mkg/litter on growth, chlorophyll *a* and carotinoids content, laser-induced fluorescence (LIF) and ultrastructure of microalga *Heterosigma akashiwo* were studied. Cells number, photosynthetic pigments content and LIF decreased after one exposition day. In next experiment days studied parameters increased, but they were significantly lower than such in control. Microalga ultrastructure in copper medium changed: vacuoles and mitochondria amount enlarged. Most of mitochondria were altered. The marked ultrastructural changes of the photosynthetic apparatus were not found.

Keywords: copper, contamination, Heterosigma akashiwo.

ВЛИЯНИЕ НОНИЛФЕНОЛА НА ЦИАНОБАКТЕРИЮ *MICROCYSTIS AERUGINOSA* В РАЗЛИЧНЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ

Ю.М. ПОЛЯК*, В.И. СУХАРЕВИЧ

ФГБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности» РАН,
Санкт-Петербург

Рассмотрено влияние гормоноподобного ксенобиотика нонилфенола на возбудителя токсичного «цветения» воды — цианобактерию *Microcystis aeruginosa*, в различных окислительно-восстановительных условиях. В результате исследования выявлены существенные изменения в процессах роста, фотосинтеза и образования цианотоксинов *M. aeruginosa* под действием поллютанта. Ингибирующее действие нонилфенола на рост и фотосинтетические процессы у *M. aeruginosa* возрастает при изменении окислительно-восстановительных условий среды. Процесс токсинообразования цианобактерий в наибольшей степени зависит от уровня окислительно-восстановительного потенциала. При снижении редокс-потенциала от 400 до 290 мВ выход микроцистинов из клеток под действием нонилфенола многократно возрастает, в то время как в условиях повышенного редокс-потенциала (480 мВ) микроцистины в среде отсутствуют. Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли редокс-потенциала в регуляции характера и степени воздействия поллютанта на *M. aeruginosa*.

Ключевые слова: нонилфенол, цианобактерии, *Microcystis aeruginosa*, микроцистин-LR, окислительно-восстановительный потенциал.

Введение

В последние годы все более актуальной становится проблема загрязнения природной среды органическими поллютантами, такими как гормоноподобные соединения группы нонилфенолов (НФ). Эти соединения широко используются во многих промышленных производствах: в изготовлении поверхностно активных веществ (ПАВ), присадок, моющих средств, смазочных масел, красок, пестицидов и др., в результате чего их производство ежегодно возрастает [21].

В окружающую среду нонилфенол попадает, главным образом, со сточными водами и обнаруживается во всех экосистемах: в воздухе, почве, воде, донных отложениях [11, 23]. В связи с высокой токсичностью НФ для человека и водных организмов его широкое распространение в водных экосистемах вызывает тревогу у экологических служб многих стран [1]. Однако, несмотря

на значительное количество публикаций, посвященных токсическому действию нонилфенола на гидробионты высших трофических уровней [12], его влияние на цианобактерии — возбудителей токсичного «цветения» воды — практически не изучено [17].

Негативное действие цианобактерий, вызывающих токсичные «цветения», связано не только с тем, что при разложении огромного количества биомассы вода становится непригодной для человека и животных, но и с их свойством образовывать сильнодействующие опасные токсины [10]. В связи с этим представляется важным вопрос о характере и степени воздействия такого широко распространенного загрязняющего вещества, как нонилфенол, на массовые виды токсинообразующих цианобактерий.

В природных условиях взаимодействие водных организмов и поллютантов происходит под влиянием многих факторов, в том числе одного из наиболее важных физико-химических параметров среды — окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). Значительная роль ОВП определяется его влиянием на активность ферментов, на соотношение отдельных звеньев ферментативного комплекса в клетке, что в конечном итоге приводит к сдвигам в метаболизме.

К настоящему времени накоплен обширный опыт по направленной регуляции роста и метаболизма микроорганизмов различных систематических групп с

© 2016 г. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И.

* **Автор для переписки:**

Поляк Юлия Марковна

к.т.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности» РАН
197110 Санкт-Петербург, ул. Корпусная, 18

Тел. +7(812) 499-64-60, факс: +7(812) 499-64-74

E-mail: yuliapolyak@mail.ru

использованием этого фактора [8, 18]. Аналогичные, но весьма ограниченные исследования, в которых показано, что ОВП влияет не только на рост, но и на синтез фотосинтетических пигментов, цианотоксинов, на внутриклеточный фосфорный обмен, проводились и с цианобактериями [5, 6, 13, 20].

Целью настоящей работы являлось изучение характера действия НФ на цианобактерию *Microcystis aeruginosa* шт. 973 в условиях, различающихся по уровню окислительно-восстановительного потенциала. В качестве контролируемых показателей использовали рост культуры, образование фотосинтетических пигментов и цианотоксина — микроцистина-LR.

Материалы и методы

В работе использовали альгологически чистую культуру цианобактерии *Microcystis aeruginosa* Kütz (CALU 973) из коллекции Биологического института Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ). Цианобактерии выращивали и поддерживали на питательной среде BG₁₁ [22] следующего состава (г/л): NaNO₃ — 1,5, KH₂PO₄×3H₂O — 0,04, MgSO₄×7H₂O — 0,075, CaCl₂×2H₂O — 0,036, кислота лимонная — 0,006, цитрат железа — 0,006, Na₂CO₃ — 0,02, ЭДТА — 0,001. В питательную среду вносили раствор металлов в количестве 1 мл на 1 литр среды. Состав раствора металлов (г/л): H₃BO₃ — 2,86, MnCl₂×H₂O — 1,81, ZnSO₄×7H₂O — 0,222, Na₂MoO₄×2H₂O — 0,39, CuSO₄×5H₂O — 0,08, CoSO₄×7H₂O — 0,049. Нонилфенол (Sigma-Aldrich, Германия) вносили в среду в концентрации 0,24–0,65 мг/л. Уровень ОВП в среде регулировали с использованием восстановителя (Na₂S₂O₃) и окислителя (K₃[Fe(CN)₆]).

Культивирование проводили в течение 21 суток в статических условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. В качестве посевного материала использовали культуру цианобактерий конца логарифмической фазы роста в количестве 5% по объему. Температура культивирования составляла 25 °С, интенсивность освещения — 25 μmol/m²/s, при световом режиме 12 часов — свет, 12 часов — темнота.

Прирост биомассы учитывали весовым методом. Контроль пигментного комплекса осуществляли по изменению содержания хлорофилла *a*, каротиноидов и фикобилинпротеинов, определяемых по оптической плотности характерных полос поглощения на спектрофотометре Genesys 10 UV scanning (Thermo Spectronic, США). Экстракцию хлорофилла *a* и каротиноидов проводили

90% ацетоном при 4 °С в течение 24 часов. Концентрацию хлорофилла *a* рассчитывали по формуле Jeffrey а. Humphrey [14]. Содержание каротиноидов рассчитывали по уравнению, предложенному Parsons а. Strickland [16].

Микроцистин-LR (MC-LR) из клеток цианобактерий экстрагировали метанолом по методу Lawton et al. [15]. Концентрацию микроцистина-LR определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Hewlett-Packard» HP1090 с диодно-матричным детектором (длина волны 238 нм, разрешение 1,2 нм). Условия хроматографирования: колонка Luna фирмы Phenomenex, температура — 35 °С, скорость потока — 1 мл/мин., детекция — 215 нм, элюент — 30%-ный раствор ацетонитрила (растворитель А) и 50%-ный раствор ацетонитрила (растворитель Б), подкисленные 0,1% ТХУК, объем пробы — 0,2 мл. Стандартный раствор микроцистина-LR был получен от Alexis Corporation (Lausen, Швейцария).

Определение Eh осуществляли с помощью рН-метра N5170. Для измерения использовали платиновые игольчатые электроды диаметром 0,5 мм. В качестве электрода сравнения использовали хлоридсеребряный электрод ЭВЛ-1М4 в насыщенном растворе KCl, а в качестве электролитического ключа — 3% агар-агар в насыщенном растворе KCl. Электроды стерилизовали в водном растворе в автоклаве при 1 атмосфере в течение 30 мин.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета компьютерных программ Statistica 10.0 (StatSoft).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования характера и степени воздействия нонилфенола на процессы жизнедеятельности цианобактерий *Microcystis aeruginosa* 973 представлены на рисунке 1.

Как следует из данных, приведенных на рисунке 1, нонилфенол оказывает на *M. aeruginosa* выраженное токсическое действие. В сравнительно низкой концентрации — 0,65 мг/л, он подавляет прирост биомассы цианобактерий на 48%, продуктивность по хлорофиллу *a* — на 18%, каротиноидам — на 26%. Содержание микроцистина-LR в клетках цианобактерий снижается на 38%, в то время как концентрация внеклеточного токсина возрастает в 3,5 раза. Увеличение концентрации микроцистина в среде, вероятно, связано с повышением проницаемости клеточных мембран под действием НФ, а также с высвобождением токсинов в процессе отмирания клеток цианобактерий. Учитывая устойчивость

микроцистинов и связанную с ней проблему накопления в природных водах [2], этот факт приобретает особую экологическую значимость.

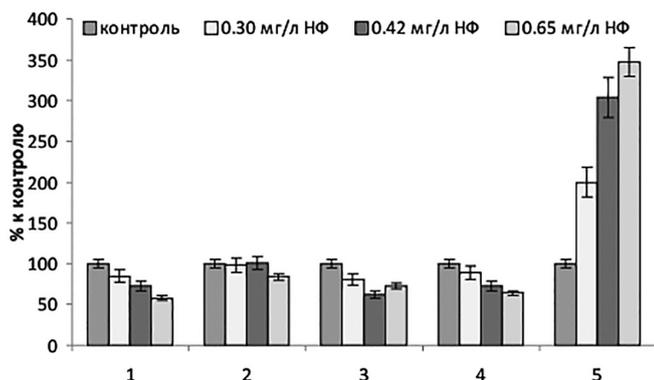


Рис. 1. Влияние нонилфенола на образование биомассы (1), хлорофилла *a* (2), каротиноидов (3), внутриклеточного микроцистина-LR (4) и внеклеточного микроцистина-LR (5) *Microcystis aeruginosa* 973 (контроль — среда без НФ)

Значительное действие на изучаемые процессы у *M. aeruginosa* оказывает и окислительно-восстановительный потенциал среды (табл. 1).

Таблица 1

Влияние окислительно-восстановительного потенциала на рост, фотосинтез и токсинообразование *M. aeruginosa* 973

ОВП, мВ	Биомасса, г/л	Хлорофилл <i>a</i> , мг/г асб	Каротиноиды, мг/г асб	Внутриклеточный МС-LR, мг/г асб
154	0,18±0,03	14,45±1,07	1,53±0,21	0,68±0,16
228	0,22±0,04	15,07±0,89	1,90±0,34	1,70±0,25
310	0,28±0,03	19,54±1,16	2,53±0,15	2,16±0,31
400	0,27±0,02	19,32±0,98	2,46±0,17	2,70±0,22
475	0,20±0,01	12,49±0,82	2,50±0,22	2,90±0,18
508	0,13±0,02	8,13±0,56	2,40±0,19	4,07±0,39
530	н/р*	0	0	0

Примечание: * нет роста

Как следует из данных, представленных в таблице 1, при снижении ОВП прирост биомассы цианобактерий уменьшается, как и количество фотосинтетических пигментов и цианотоксинов в клетках. Процесс токсинообразования наиболее чувствителен к окислительно-восстановительным условиям среды, и при снижении ОВП с 400 (контроль) до 150 мВ содержание внутриклеточных микроцистинов снижается на 75%.

При повышенном уровне окислительно-восстановительного потенциала (508 мВ) происходит значительное торможение роста культуры, а при 530 мВ — полное подавление роста. В условиях повышенного ОВП снижается фотосинтетическая активность цианобактерий на фоне увеличения концентрации микроцистина-LR в среде. Таким образом, характер действия нонилфенола и окислительно-восстановительного потенциала как фактора среды на *M. aeruginosa* 973 во многом совпадает. Имеющиеся отличия выражаются, главным образом, в степени влияния исследованных факторов на синтез метаболитов.

С целью изучения совместного действия окислительно-восстановительного потенциала и нонилфенола на процессы метаболизма *M. aeruginosa* 973 ОВП питательной среды (контроль — 400 мВ) снижали до 290 мВ или повышали до 480 мВ с помощью восстановителя или окислителя, соответственно. НФ использовали в двух концентрациях — 0,42 и 0,65 мг/л. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Совместное действие ОВП среды и нонилфенола на процессы роста и фотосинтеза *M. aeruginosa* 973

НФ, мг/л	ОВП		
	290 мВ	400 мВ	480 мВ
Прирост биомассы, % к контролю			
—	100±8	100±6	90±5
0,24	51±5	73±7	50±4
0,50	30±3	58±6	34±2
Хлорофилл <i>a</i> , % к контролю			
—	100±5	100±7	71±6
0,42	45±3	101±8	38±4
0,65	34±3	84±5	27±2
Каротиноиды, % к контролю			
—	98±8	100±6	78±6
0,42	32±3	62±5	52±4
0,65	29±3	53±4	22±3

В условиях пониженного ОВП ингибирующее действие НФ на рост культуры усиливалось в 1,5–2,0 раза по сравнению с его воздействием в контрольных по ОВП условиях (400 мВ). Аналогичные результаты получены и в условиях повышенного уровня ОВП.

Усиление ингибирующего действия НФ на цианобактерии при изменении редокс-потенциала проявлялось не только в процессах роста *M. aeruginosa*, но и в процессах фотосинтеза. Так, при снижении ОВП среды до 290 мВ продуктивность культуры по фотосинтетическим пигментам — хлорофиллу *a* и каротиноидам — уменьшалась до 29–34% в сравнении с контролем. Еще более заметный тормозящий эффект на продуктивность

культуры по хлорофиллу *a* и каротиноидам (22–27% к контролю) можно было наблюдать при повышенном ОВП среды (480 мВ).

Содержание микроцистина в биомассе снижалось в условиях пониженного ОВП (290 мВ) на фоне увеличения концентрации токсина в среде в 3,7 раза (рис. 2).

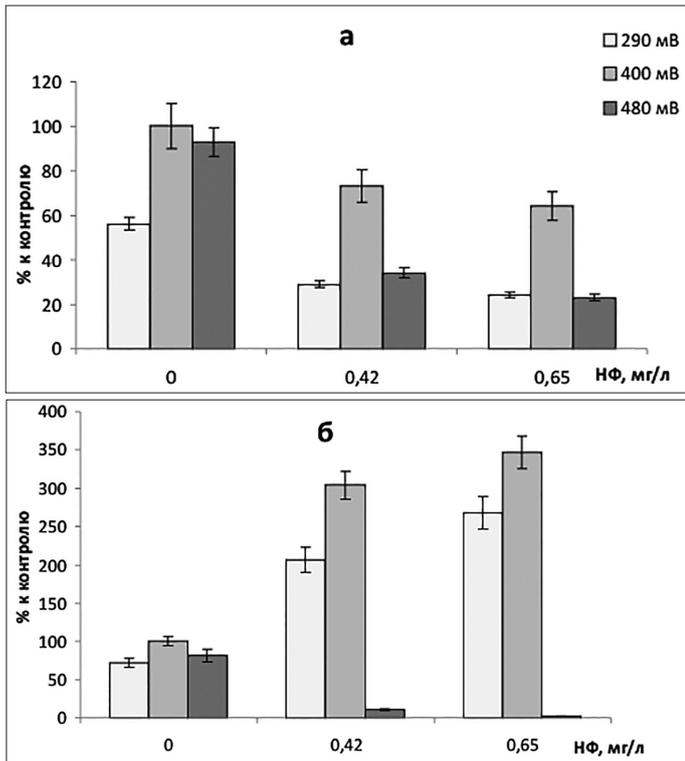


Рис. 2. Влияние нонилфенола на концентрацию внутриклеточных (а) и внеклеточных (б) микроцистинов, синтезируемых культурой *M. aeruginosa* 973 в различных окислительно-восстановительных условиях

Аналогичный эффект ингибирования синтеза микроцистинов и их повышенного выхода из клеток в среду ранее был найден при изучении влияния на *M. aeruginosa* других стрессовых факторов, таких как азольные соединения и тяжелые металлы [7, 19].

При увеличении ОВП до 480 мВ также происходило резкое снижение количества токсинов в клетках цианобактерий (содержание внутриклеточного микроцистина составило лишь 23% от контрольного уровня), однако в среде микроцистины полностью отсутствовали. Сопоставление данных, представленных на рисунке 2, с результатами, полученными при воздействии на *M. aeruginosa* только нонилфенола, показывает, что ОВП является фактором, активно влияющим на цианобактерии как в контрольных, так и в стрессовых условиях. Одним из возможных механизмов снижения количества

образуемых микроцистинов может быть их связывание с SH-группами белков, которые синтезируются цианобактериями при адаптации к новым условиям или в ответ на стрессовое воздействие [3, 4]. Известно, что микроцистины образуют прочные тиоэфирные связи с SH-группами белков *M. aeruginosa* [24], при этом связыванию МС в значительной мере способствуют условия окислительного стресса, которые могут создаваться повышенным уровнем ОВП [9].

Заключение

Таким образом, нонилфенол токсичен для цианобактерии *M. aeruginosa* 973 и в сравнительно низких концентрациях – 0,42–0,65 мг/л – оказывает существенное влияние на процессы роста, фотосинтеза и образования микроцистинов. Одним из особо нежелательных последствий такого воздействия, с экологической точки зрения, является значительное (до 3,5 раз) увеличение количества микроцистинов в среде. Однако, как показали наши исследования, на характер и степень воздействия нонилфенола можно влиять, изменяя окислительно-восстановительный потенциал среды. Важность этого фактора для цианобактерий заключается и в том, что они способны развиваться как в верхних, насыщенных кислородом слоях водоемов, так и в придонных, с низкой концентрацией кислорода, что, по сути, означает возможность их существования в широком диапазоне значений ОВП.

Экспериментами, проведенными при пониженном до 290 мВ и повышенном до 480 мВ уровне редокс-потенциала среды показано, что в этих условиях усиливается ингибирующее действие ОВП на изучаемые метаболические процессы у *M. aeruginosa*, за исключением процесса выхода токсинов из клеток цианобактерий в окружающую среду. В отличие от действия только нонилфенола, при повышенном редокс-потенциале и концентрации НФ 0,65 мг/л содержание токсинов в биомассе снижается в среднем на 80%, при практически полном их отсутствии в среде. Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли редокс-потенциала среды в регуляции характера и степени воздействия поллютанта на цианобактерии. Не исключено, что это свойство распространяется и на другие микроорганизмы.

Авторы выражают искреннюю признательность Е.А. Протасову (ГосНИИ ОЧБ) за помощь при определении микроцистинов.

Литература

1. Бураковский А.И., Пивень Н.В., Лухверчик Л.Н. Нонилфенол как повреждающий фактор регуляторных систем организма // Труды БГУ. — 2010. — Т. 5. — Ч. 1. — С. 243–253.
2. Волошко Л.Н., Плющ А.В., Титова Н.Н. Токсины цианобактерий (Cyanobacteria, Cyanophyta) // Альгология. — 2008. — Т. 18. — № 1. — С. 3–20.
3. Зорина А.А., Миронов К.С., Степанченко Н.С., Синцова М.А., Коробан Н.В., Зинченко В.В., Куприянова Е.В., Аллахвердиев С.И., Лось Д.А. Системы регуляции стрессовых ответов у цианобактерий // Физиология растений. — 2011. — Т. 58. — № 5. — С. 643–663.
4. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Савельев И.Б. Распределение ванадия в клетках цианобактерий *Anacystis nidulans* и *Nostoc muscorum*: взаимосвязь с SH-содержащими низкомолекулярными белками // Вестн. МГУ. Сер. Биология. — 1993. — № 4. — С. 58–61.
5. Поляк Ю.М., Шигаева Т.Д., Кудрявцева В.А., Сухаревич В.И. Влияние аэрации и редокс-потенциала на рост, фотосинтез и токсинообразование цианобактерии *Microcystis aeruginosa* 973 // Вода: химия и экология. — 2014. — № 10. — С. 60–68.
6. Поляк Ю.М., Шигаева Т.Д., Кудрявцева В.А., Сухаревич В.И. Окислительно-восстановительный потенциал в процессе культивирования цианобактерий *Anabaena variabilis* // Вода: химия и экология. — 2013. — № 8. — С. 66–70.
7. Поляк Ю.М. Азольные соединения как фактор воздействия на массовые виды цианобактерий // Вода: химия и экология. — 2015. — № 12. — С. 10–19.
8. Сухаревич В.И., Семенова И.Р., Денисова Н.П. Влияние аэрации и окислительно-восстановительного потенциала среды на рост и биосинтез протеиназ фибринолитического действия грибом *Coprinus cinereus* // Биотехнология. — 1994. — № 11–12. — С. 16–19.
9. Cameron J.C., Pakrasi H.B. Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Plant Physiology. — 2010. — Vol. 154. — P. 1672–1685.
10. Crayton M.A. Toxic cyanobacteria blooms: A field/laboratory guide. — Office of Toxic Substances, Washington Department of Health, 1993. — 21 p.
11. David A., Fenet H., Gomez E. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations // Marine Pollution Bulletin. — 2009. — Vol. 58. — P. 953–960.
12. Hense B.A., Juttner I., Welzl G., Severin G.F., Pfister G., Behechti A., Schramm K.-W. Effects of 4-nonylphenol on phytoplankton and periphyton in aquatic microcosms // Environ. Toxicol. Chem. — 2003. — Vol. 22. — P. 2727–2732.
13. Jeffrey C.C., Himadri B.P. Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Plant Physiol. — 2010. — Vol. 154. — P. 1672–1685.
14. Jeffrey S.W., Humphrey G.E. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanz. — 1975. — Vol. 167. — P. 191–194.
15. Lawton L.A., Edwards C., Codd G.A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters // Analyst. — 1994. — Vol. 119. — P. 1525–1530.
16. Parsons T.R., Strickland J.D.H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids // J. Mar. Res. — 1963. — Vol. 21. — P. 155–163.
17. Perron M.-C., Juneau P. Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria // Environmental Research. — 2011. — Vol. 111. — P. 520–529.
18. Petrov R.R., Utkin I.B., Munilla R., Fernandez V.M., Popov V.O. Effect of redox potential on the catalytic properties of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1 // Arch. Biochem. Biophys. — 1989. — Vol. 268(1). — P. 306–313.
19. Polyak Yu., Zaytseva T., Medvedeva N. Response of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to environmental pollution // Water Air Soil Pollut. — 2013. — Vol. 224(4). — P. 1494–1508.
20. Shi X., Yang L., Niu X., Xiao L., Kong Z., Qin B., Gao G. Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness // Microbiological Research. — 2003. — Vol. 158(4). — P. 345–352.
21. Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters // Environment International. — 2008. — Vol. 34. — P. 1033–1049.
22. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales) // Bact. Rev. — 1971. — Vol. 35(2). — P. 171–205.
23. Vazquez-Duhalt R., Marquez-Rocha F., Ponce E., Licea A.F., Viana M.T. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific Review // Applied Ecology and Environmental Research. — 2005. — Vol. 4. — P. 1–25.
24. Zilliges Y., Kehr J.-C., Meissner S., Isida K., Mikkat S., Hagermann M., Kaplan A., Borner T., Dittman E. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — No. 3. — P. 1–11.

Список сокращений

НФ — нонилфенол;

ПАВ — поверхностно-активные вещества;

ОВП — окислительно-восстановительный потенциал;

МС-LR — микроцистин-LR;

ТХУК — трихлоруксусная кислота;

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

INFLUENCE OF NONYLPHENOL ON THE CYANOBACTERIUM *MICROCYSTIS AERUGINOSA* IN DIFFERENT REDOX ENVIRONMENTS

Yu.M. POLYAK, V.I. SUKHAREVICH

St. Petersburg Scientific Research Center for Ecological Safety, RAS, St. Petersburg

The effect of an hormone-like xenobiotic nonylphenol (NP) on bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under different redox conditions was investigated. NP induced significant changes in *M. aeruginosa*'s growth, photosynthesis and cyanotoxin production. The inhibitory effect increased with changing redox conditions. Toxin production was the most sensitive to redox potential of the medium. The microcystin release into the environment, induced by NP, increased manifold when redox potential decreased from 400 to 290 mV, while no microcystins were found in the medium when redox potential was increased to 480 mV. Our results demonstrate that redox potential plays an important role in regulation of NP effect on *M. aeruginosa*.

Keywords: nonylphenol, cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*, microcystin-LR, redox potential.

ДЕЙСТВИЕ ЛЕКТИНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ *CUSCUTA EUROPEA* НА МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТКИ

Э.С. ХАШИМОВА*, К.А. КАХАРОВА, Е.О. ТЕРЕНТЬЕВА, Н.Ж. САГДИЕВ

Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,
Ташкент, Республика Узбекистан

В работе с помощью комплекса биохимических методов показано, что сумма белков, а также осадок и супернатант, полученные высаливанием 20% сульфатом аммония из суммы гликопротеидов повилики, проявили незначительные антиоксидантные свойства, снижая уровень малонового диальдегида (МДА), а также активируя ферменты антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазу и глутатионредуктазу.

Ключевые слова: лектиноподобные белки, антиоксидантные свойства, повилика, *Cuscuta europeae*.

Введение

Лектины являются одним из функционально значимых белков, участвующих в защитной стратегии растений и обладающих широким диапазоном действия, что во многом стимулирует исследователей к поиску новых источников их выделения [17, 20]. Известны растительные лектины, обладающие цитотоксическим действием [21]. Цитотоксические свойства этих белков, возможно, связаны с их действием как на мембранном, так и на внутриклеточном уровнях [20].

В настоящее время внимание ученых привлекла большая группа растений паразитов (*Haustoria*), к которым относятся различные виды омелы (*Viscus alba L.*) и повилики (*Cuscuta L.*): у последних определены различные цитотоксины [16, 23]. Наиболее изучены цитотоксины белковой природы, такие как вискотоксины, пуротоксины, выделенные из различных видов омелы, активно подавляющих рост раковых клеток в культуре тканей.

Одним из малоизученных объектов являются лектиноподобные белки паразитирующих растений. Интерес к растениям-паразитам рода *Cuscuta* объясняется тем, что они используются для лечения различных форм опухолей, что описано в анналах Тибетской медицины, тру-

дах Авиценны. Известен факт, приводимый в рецептах народной медицины, об использовании настоя повилики как противоопухолевого средства [12]. В составе экстракта повилики китайской (*Cuscuta chinensis*) обнаружены противоопухолевые вещества гликозидоподобной природы [14, 16, 26]. В Средней Азии и Казахстане выявлены более 25 видов повилик.

Ранее нами была изучена канцеролитическая активность различных видов повилики, произрастающих в Центральной Азии. Получены экстракты из трех видов: *Cuscuta europeae*, *Cuscuta lupuliformis*, *Cuscuta attenuate*, паразитирующих соответственно на луговых травах, на побегах ивы и на фруктовых кустарниках. Установлено, что экстракты разных видов повилики оказались цитотоксичными в культуре тканей (от 40–80% подавления роста опухолевых клеток КМЛ — рак кожи) [6, 8].

Целью данной работы являлось изучение влияния лектиноподобных гликопротеидов повилики на внутриклеточные процессы в клетках, включая антиоксидантную активность.

Материалы и методы

В качестве растительного сырья использовали семена повилики (*Cuscuta europeae*), произрастающие на луговых травах.

Лектиноподобные белки (ЛПБ) были выделены из семян повилики путем экстракции солевым раствором с последующим ступенчатым высаливанием сульфатом аммония до конечной концентрации 20 и 50%. После центрифугирования полученные супернатанты были обозначены C_{20} и C_{50} и осадки — ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ —

© 2016 г. Хашимова Э.С., Кахарова К.А., Терентьева Е.О., Сагдиев Н.Ж.

* Автор для переписки:

Хашимова Зайнат Сагтаровна

д.б.н., старший научный сотрудник,

Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз
100125 Узбекистан, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83

E-mail: Zaynat_Kh@mail.ru

диализованы против дистиллированной воды, лиофильно высушены и использованы для дальнейшей работы.

Содержание белка определяли по методу Лоури [22]. Содержание общих сахаров определяли антроносерноокислотным методом [13].

Оценку гемагглютинирующей активности лектинов проводили путем постановки реакции гемагглютинации в иммунологических планшетах [1, 7, 10]. Установлено, что наибольшую гемагглютинирующую активность проявляли фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀, специфичность к углеводам глюкозе и маннозе проявила фракция ЛПБ₅₀.

Одной из систем оценки биологической активности, а также определения характера действия новых белковых веществ является культура клеток [25].

Ранее нами была показана цитотоксическая активность *Cuscuta europa* на различных типах клеток [3, 4], а также впервые было продемонстрировано, что лектиноподобные белки из семян повилики *Cuscuta europa* оказывают значительное подавляющее влияние на регуляцию объема тимоцитов в условиях гипосмотического стресса [2].

В настоящей работе была изучена цитотоксическая активность ЛПБ *Cuscuta europa* на клетках рака молочной железы С₁₂₀. Цитотоксичность оценивали биохимически с помощью МТТ-метода, подсчета живых клеток и по высвобождению из клеток лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [3].

Для определения цитотоксического действия клетки С₁₂₀ рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 20–30 тыс. клеток/мл в 100 мкл среды ДМЕМ или RPMI 1640 с 10% сыворотки эмбриона теленка и куль-

тивировали при температуре 37 °С в СО₂-инкубаторе. Через сутки вводили белки в дозах 100, 10 и 1 мкг/мл на 100 мкл среды, культивировали клетки в течение 24 часов и далее вводили в клетки МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид] для выявления живых клеток. После 1-часовой инкубации среду осторожно сливали, добавляли ДМСО и инкубировали 20 мин., затем измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 620 нм.

Второй способ оценки цитотоксичности был основан на измерении высвобождения лактатдегидрогеназы в культуральную среду. Для этого через 24 часа после добавления белков из каждой лунки растущих клеток отбирали по 50 мкл культуральной жидкости для измерения активности ЛДГ и вносили в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета, содержащего субстраты для измерения ЛДГ. Планшет инкубировали 30 мин. при комнатной температуре. Через 30 мин. интенсивность окрашивания определяли по оптической плотности. Активность ЛДГ оценивали спектрофотометрическим методом при 340 нм на микропланшетном ридере.

Для установления подавления роста клеток подсчитывали живые клетки. Для этого клетки снимали версенном, окрашивали трипановым синим и под микроскопом проводили подсчет клеток.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные на клетках С₁₂₀, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Действие гликопротеидов *Cuscuta europa* на культуру клеток С₁₂₀

Образцы \ Доза, мкг/мкл	Подавление включения МТТ в клетки, %			Подавление роста клеток, %			Активность ЛДГ, %.		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Σ фракция	73,6	45,0	34,0	69,8	42,1	32,0	28,0	8,8	3,9
С ₂₀	48,2	36,0	27,6	47,3	39,0	25,0	23,6	6,0	3,0
С ₅₀	46,8	45,0	13,4	46,0	41,0	14,0	24,1	5,9	2,2
ЛПБ ₂₀	75,0	51,2	22,1	76,4	51,0	19,0	30,0	5,5	2,7
ЛПБ ₅₀	76,0	64,2	45,0	75,0	58,0	41,0	29,4	4,1	5,7
Цисплатин	92,0	78,0	59,0	91,0	79,0	54,5	31,7	22,9	4,4

Контролем служили клетки без воздействия веществ, где уровень включения МТТ в клетки было 100% (0% подавления). Цисплатин взят нами в качестве положительного контроля, указывающего на чувствительность клеток к воздействию препаратов.

Как видно из таблицы 1, белковые фракции повилки оказывают различное воздействие на культуру клеток. Наибольшую цитотоксическую активность проявили суммарная фракция и фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ — 73,6, 75,0 и 76,0% при дозе белка 100 мкг/мл, а также фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ — 51,2 и 64,2%, соответственно. Аналогичные результаты получены при подсчете клеток трипановым синим и по определению уровня активности ЛДГ.

Таким образом лектиноподобные белки *Cuscuta europa* проявляют цитотоксическую активность в культуре клеток.

Установлено, что соединения белковой природы обнаруживают антиоксидантные свойства [15, 18]. Среди растений определенный интерес представляло изучение защитных свойств, оказываемых повилкой (*Cuscuta europa*) против перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Известно, что спиртовые экстракты повилки (*Cuscuta campestris* Juncker) могут быть использованы для ингибирования процессов ПОЛ в микросомах печени крыс и что эффективность их защиты сопоставима с таковой для альфа-токоферола, общепризнанного антиоксиданта, присутствующего в организме человека [19]. В связи с этим изучена антиоксидантная активность ЛПБ повилки.

В экспериментах использовались беспородные мыши. Животных декапитировали, быстро извлекали печень и помещали в среду, содержащую 0,05 М трис-НСl, рН=7,5, ЭДТА. Ткань растирали в течение 15 мин в гомогенизаторе Поттера — Эльвегейма. Затем 15 мин центрифугировали 800 об/мин, отбирая супернатант.

Уровень МДА, диеновые конъюгаты и диеновые кетоны определяли по методу И.Д. Стальной и соавт. [11]. Расчет продуктов проводили, используя коэффициент молярной экстинкции.

Активность СОД определяли по методу Б.Н. Матюшина и соавт. [9]. Активность рассчитывали по проценту торможения (Т%) восстановления тетразолиевого синего в щелочной среде.

Активность каталазы определяли по методу М.А. Королюка и соавт. [5], принцип которого основан на способности H₂O₂ образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Измерения проводились при длине волне 410 нм.

Активность глутатионредуктазы определяли в реакционной среде фосфатного буфера при длине волны 340 нм, а также глутатионтрансферазу определяли по методу Turella [24].

Все измерения осуществляли спектрофотометрически на микропланшетном ридере. Препаратом сравнения служил флавоноид кверцетин.

Установлено, что в концентрации 100 мкг/мл кверцетин увеличивал содержание конъюгированных диенов в 5 раз по сравнению с контролем. Рост кетодиенов и диеновых конъюгатов наблюдался и при воздействии как суммарных белков растения *Cuscuta europa*, так и при действии отдельных его фракций.

В концентрации 100 мкг/мл кверцетин снижал содержание малонового диальдегида (МДА) и составил 68,6% по сравнению с контролем. При воздействии 100 мкг/мл суммарных белков растения *Cuscuta europa* содержание МДА составило на 42% ниже, чем в контроле. И супернатант, и осадок, полученные осаждением 50% сульфатом аммония, при 100 мкг/мл проявили антиоксидантную активность, снижая содержание малонового диальдегида на 34 и 49%, соответственно. При снижении концентрации до 10 мкг/мл антиоксидантная активность не только не сохранилась, но и возросла — 73,7 и 67%, соответственно. Вероятно, повышение активности белков при снижении их концентрации связано с конформационными перестройками и, как следствие, увеличением доступности к мембране.

Интересно отметить, что схожий эффект проявили и супернатант с осадком, полученным осаждением 20%-ным раствором сульфата аммония. Если при действии осадка в концентрации 100 мкг/мл содержание МДА составило на 5% ниже, чем в контроле, а при воздействии супернатанта и вовсе наблюдались незначительная прооксидантная активность (содержание малонового диальдегида оказалось выше на 7%), то при снижении концентраций белка до 10 мкг/мл содержание МДА оказалось одинаковым и составило 27,7% от контроля.

Таким образом, наибольшую антиоксидантную активность во всех представленных концентрациях проявил осадок, полученный высаливанием 20% сульфатом аммония из суммы белков.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия супероксид-анион радикалом, генерируемым в системе феназинметасульфат + НАДН.

Показано, что среди ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ наиболее активными в отношении супероксиддисмутазы оказа-

лись суммарные белки, а также супернатант и осадок, полученные осаждением 20% сульфатом аммония из суммы белков.

Активность каталазы оценивали по интенсивности развившегося окрашивания комплекса перекись водорода + молибдат аммония. В эксперименте ни препарат сравнения, ни одна из исследуемых фракций не обнаружили активности каталазы.

Глутатионредуктаза (ГР) — фермент антиоксидантной защиты клетки, осуществляющий регенерацию восстановленного глутатиона из окисленной его формы путем НАДФН-зависимого восстановления. О скорости ГР-реакции судили по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДФН, протекающего за счет осуществления реакции восстановления глутатиона под воздействием ГР.

Было найдено, что фракции ЛПБ по отношению к ферменту глутатионредуктазе активности не проявляли. Также было установлено, что эти гликопротеиды, как и кверцетин не обнаруживали глутатионтрансферазной активности.

Полученные результаты представляют несомненный научный интерес для дальнейшего исследования.

Заключение

Таким образом, нами впервые было продемонстрировано, что сумма белков, а также осадок и супернатант, полученные высаливанием 20% сульфатом аммония из суммы гликопротеидов повилики, проявили незначительные антиоксидантные свойства, снижая уровень МДА, а также активируя ферменты антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазу и глутатионредуктазу.

Литература

1. Голынская Е.Л., Поспелов С.В., Самородов В.Н. Способ оценки физиологической активности лектинов к сахарам // А.С. № 1732276 (СССР), 1992.
2. Кахарова К.А., Хашимова Э.С., Сагдиев Н.Ж., Рустамова С.И., Сабиров Р.Э. Влияние гликопротеидов повилики на регуляцию объема эритроцитов при гипосмотическом стрессе // Узб. биол. журнал. — 2015. — № 3. — С. 3–5.
3. Кахарова К.А., Хашимова Э.С., Сагдиев Н.Ж. Гликопротеиды паразитирующих растений (*Cuscuta europa*) // В кн., посвященной памяти акад. В.П. Макеева «Фундаментальные и прикладные проблемы науки». — М., 2014. — С. 122–128.
4. Кахарова К.А., Хашимова Э.С., Сагдиев Н.Ж. Лектиноподобные белки повилики: характеристика и биологическая активность // Евразийский союз ученых (ЕСУ). — 2016. — № 3(24). — С. 40–43.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — №1. — С. 16–19.
6. Кузнецова Н.Н., Хашимова Э.С., Мавлонов Г., Кадряева Г. Биологическая активность компонентов повилики // Тез. конф. «Актуальные проблемы химии природных соединений». — Ташкент, 2009. — С. 209.
7. Луцки М.Д. и др. Лектины. — Львов: Изд. Львовск. ун-та, 1981. — 156 с.
8. Мавлонов Г.Т., Убайдуллаева Х.А. и др. / Труды международной конф. — Алматы, 2004. — С. 201–203.
9. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении // Лаб. дело. — 1991. — № 7. — С. 16–19.
10. Поспелов С.В. Лектины представителей рода эхинацея (*Echinacea mjench.*). Методические аспекты оценки активности // Химия растительного сырья. — 2012. — № 3. — С. 143–148.
11. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // В кн.: Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 63–64.
12. Федюшин М.П. Некоторые материалы к истории русской онкологии // Вопр. онкол. — 1953. — Т. XXVI. — № 6. — Р. 278–287.
13. Хашимова Э.С., Мангутова Ю.С., Леонтьев В.Б. Структурно-функциональное изучение гликопротеидов хлопчатника // Химия природ. соедин. — 1999. — № 3. — С. 376–384.
14. Anis E. et. al. Sterols and Sterol Glycosides from *Cuscuta reflexa* // Natural Product Sciences. — 1999. — Vol. 5(3). — Р. 124–126.
15. Anjum et al. Comparative evaluation of antioxidant potential of parasitic plant collected from different hosts // J. Food Process Technol. — 2013. — Vol. 4(Issue 5). — 1000228. doi:10.4172/2157-7110.1000228.
16. Du X-Mkohinata K., Kawasaki T., Guo Y-T., Miyahara K. // Phytochemistry. — 1998. — Vol. 48. — Р. 843–850.
17. Dwek B.A. Glycobiology: toward understanding the function of sugars // Chem. Rev. — 1996. — Vol. 96. — Р. 683–720.
18. Elias R.J., Kellerby S.S., Decker E.A. Antioxidant activity of proteins and peptides // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. — 2008. — Vol. 48(5). — Р. 430–441.
19. Kala C.P., Farooquee N.A., Dhar U. Prioritization of medicinal plants on the basis of available knowledge, existing practices and use value status in Uttaranchal, India // Biodiver. Conserv. — 2004. — Vol. 13. — No. 2. — Р. 453–469.
20. Lis H., Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional // J. Biochem. — 1993. — Vol. 218. — Р. 1–27.

21. Lord J.M. The use of cytotoxic plant lectins in cancer therapy // *Plant Physiol.* – 1987. – Vol. 85. – P. 1–3.
22. Lowry O., Rosenbroung R., Parr A., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–269.
23. Miyahara K., Du X-M., Watanabe M., Sugiura C., Yahara S., Nohara T. // *Chem. Farm. Bull.* – 1996. – Vol. 44. – P. 481–488.
24. Turella P., Pedersen J.Z., Caccuri A.M. et al. Glutathione transferase superfamily behaves like storage proteins for dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex in heterogeneous systems // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol. 278(43). – P. 42294–42299.
25. Zeraati F. et al. In vitro cytotoxic effect of *Cuscuta chinensis* whole extract on human acute lymphoblastic leukemia cell line // *IJMS.* – 2010. – Vol. 35. – P. 313–315.
26. Zhelev Z.D. et al. Isolation, partial characterization and complement inhibiting activity of a new glycoprotein from *cuscuta euroea* // *BBRC.* – 1994. – Vol. 202. – P. 186–194.

THE ACTION OF LECTIN-LIKE PROTEINS OF *CUSCUTA EUROPEA* ON CELL METABOLISM

Z.S. HASHIMOVA, K.A. KAHAROVA, E.O. TARENTYEVA, N.J. SAGDIEV

Acad. A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent, Uzbekistan

In work using complex biochemical methods was demonstrated that the sum of proteins and precipitate and the supernatant obtained by salting to 20% ammonium sulfate from the amount of glycoproteins of dodder, showed minor antioxidant features, reducing the level of malondialdehyde (MDA) and activating the enzymes of the antioxidant defense – superoxide dismutase and glutathione reductase.

Keywords: lectin proteins, antioxidant properties, dodder, *Cuscuta europea*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ДИСПЕРСНЫХ СВЕЯЩИХСЯ ЧАСТИЦ РАКОВЫХ КЛЕТОК

М.С. АБДУЛЛАХОДЖАЕВА², А.Р. ФАТТАХОВ², Э.С. ХАШИМОВА^{1*},
К.А. КАХАРОВА¹, Н.Ж. САГДИЕВ¹

¹ *Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,*
² *Республиканский патологоанатомический центр, Ташкент, Республика Узбекистан*

В культивируемых клетках HeLa обнаружены дисперсные светящиеся частицы (ДСЧ) в поляризованном свете, которые ранее были найдены у пациентов с диагнозом рака шейки матки. Изучено влияние на ДСЧ противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия.

Ключевые слова: дисперсные светящиеся частицы, рак шейки матки, противоопухолевые препараты.

Одной из актуальных задач современной онкологии является изучение механизма возникновения злокачественной клетки и стадии развития опухоли. Академиком АН Республики Узбекистан М.С. Абдуллаходжаевой совместно со специалистами НИИ электроники (Крахмалев В.А.) в 2006 году были обнаружены на поверхности эпителиальных клеток шейки матки больных с диагностированным раком шейки матки характерные дисперсные, светящиеся в поляризованном свете частицы. Было зафиксировано образование на поверхности мембран раковых клеток шейки матки сферических пузырьков различного диаметра, которые в отраженном свете давали мелкие светящиеся округлые отражения [1].

Такие дисперсные светящиеся частицы (ДСЧ) появлялись только в случаях диагностированного рака шейки матки. В норме, а также при наличии воспалительного или дистрофического процесса в шейке матки эти частицы не обнаруживались. Диаметр дисперсных светящихся частиц варьировал от 0,3–0,5 до 1,2–1,3 мкм. Иногда эти частицы образовывали крупные скопления, особенно вокруг ядер клеток. Часто они наблюдались в виде разбросанных структур, но локализующихся внутри контура клеток [2, 3].

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование ДСЧ в культивируемых раковых клетках и

изучение действия на них различных противоопухолевых препаратов.

Для изучения природы ДСЧ использовалась перевиваемая культура клеток HeLa.

Культура клеток служит удобным объектом для изучения биохимических процессов внутри клеток [4]. Перевиваемые раковые клетки растут в стандартизованных условиях, а именно: стандартный состав культуральной среды, температура роста клеток составляет 37 °С, 5% состав CO₂ в инкубаторе и т.д.

Клетки HeLa были суспендированы в 5 мл ростовой среды ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей антибиотик-антимикотик, L-глутамин, 10% сыворотки плода теленка. Клетки в количестве 1 млн/мл были перенесены в культуральные матрицы или 24-луночные планшеты и культивированы в CO₂ инкубаторе в течение 24 ч. Далее клетки снимались с поверхности пластика версеном, промывались культуральной средой, и их суспензия переносилась на обезжиренное предметное стекло, на котором другим предметным стеклом делался мазок, не требующий фиксации. Мазок подсыхал на воздухе от 3 до 5 минут. После этого предметное стекло помещалось мазком вниз на предметный столик отражательного оптического микроскопа «Axiovert 40 MAT», где и визуализировались ДСЧ.

При просмотре под микроскопом в поляризованном свете у 40% клеток наблюдалось ДСЧ, то есть не все клетки в перевиваемой раковой культуре HeLa содержат такие структуры.

В дальнейшем нами были изучены некоторые клинические противоопухолевые препараты известного механизма действия на культуре клеток HeLa.

© 2016 г. Абдуллаходжаева М.С., Фаттахов А.Р., Хашимова Э.С., Кахарова К.А., Сагдиев Н.Ж.

* Автор для переписки:

Хашимова Зайнат Саттаровна
доктор биол. наук,

с.н.с лаб. биорегуляторов ИБОХ АН РУз

E-mail: Zaynat_Kh@mail.ru

Для определения цитотоксического действия препаратов клетки HeLa рассеивали в 96-луночные платы в количестве 20–30 тыс. клеток/мл в 100 мкл среды ДМЕМ с 10% сыворотки плода тельца и культивировали при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. Через сутки вводили препараты линкомицин, метотрексат и цисплатин в дозах 100, 10 и 1 мкг/мл на 100 мкл среды, культивировали клетки в течение 24 часов.

Цитотоксический эффект клинических противоопухолевых препаратов известного механизма действия оценивали МТТ ([3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид])-тестом [5, 6].

Для этого через 24 часа после действия препарата в лунки осторожно вносили по 20 мкл раствора МТТ (концентрация 5 мг/мл), инкубировали 3 часа при температуре 37 °С. После этого среду осторожно сливали, добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) и инкубировали 20 мин, затем измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 620 нм. Контролем служили клетки без воздействия препаратов. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Цитотоксическое действие препаратов на клетки HeLa

Доза, мкг/мл	Образцы	Подавление включения МТТ в клетки, %		
		Метотрексат	Линкомицин	Цисплатин
1		11,8	6,6	42,3
10		35,1	17,2	59,7
100		47,8	53,5	88,2

Как следует из данных таблицы 1, клеточная линия HeLa проявляет различную чувствительность к действию клинических противоопухолевых препаратов. Так, наиболее высокую чувствительность обнаружил синтетический препарат цисплатин: при дозах 100, 10 и 1 мкг/мл подавление роста клеток по МТТ-тесту составило 88,2, 59,7 и 42,3%, соответственно. Клетки HeLa оказались менее чувствительны к препаратам метотрексату и линкомицину: при дозах 100, 10 и 1 мкг/мл подавление роста клеток по МТТ-тесту составило 47,8, 35,1, 11,8% и 53,5, 17,2 и 6,6%, соответственно.

Параллельно клетки рассеивали в количестве 1 млн/мл в 5 мл ростовой среды в культуральные матрасы, через сутки вводили препараты линкомицин, метотрексат и цисплатин в дозе 10 мкг/мл. Через 24 часа клетки снимали с матраса версеном и далее обрабатывали клетки, как описано выше, для выявления ДСЧ под микроскопом в поляризованном свете.

Как показали микроскопические исследования, в контрольных клетках наблюдаются ДСЧ (рис. 1), однако в опытных образцах не выявлено внутриклеточных ДСЧ (рис. 2).

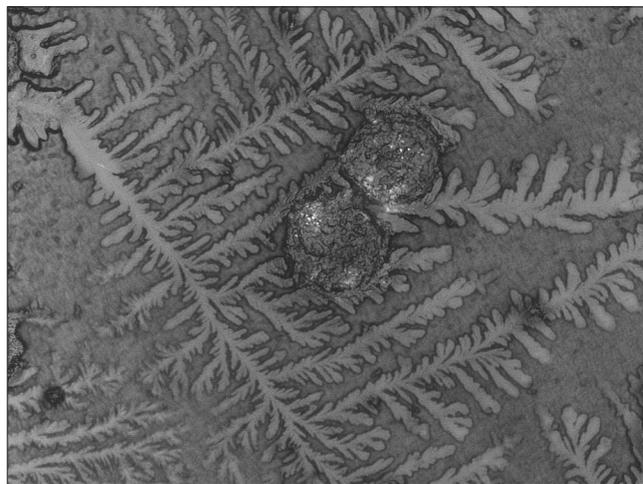


Рис. 1. Клетки HeLa. Видна делящаяся клетка, содержащая ДСЧ



Рис. 2. Клетки HeLa, культивированные в присутствии противоопухолевых препаратов

Сотрудниками академика АН РУз М.С. Абдулаходжаевой зафиксировано образование на поверхности мембран раковых клеток сферических пузырьков различного диаметра. Предполагается, что в отраженном свете такие выпятившиеся пузырьки цитоплазмы действительно могут дать мелкие светящиеся округлые отражения. Кроме диагностируемых скоплений ДСЧ, на поверхности собственно эпителиальных клеток было обнаружено также хаотичное расположение одиночных ДСЧ во внеклеточном пространстве. Оно может быть редким, но может быть и обильным. Последний вариант наблюдается при инвазивном раке шейки матки и развитии некротического процесса в опухоли.

Таким образом, нами установлено, что в культивируемых клетках HeLa встречаются характерные дисперсные светящиеся частицы в поляризованном свете. Противоопухолевые препараты цисплатин и метотрексат и антибиотик линкомицин проявляют различное цитотоксическое действие на клетки HeLa, при этом после воздействия препаратов дисперсно светящихся частиц в клетках не обнаружено.

Литература

1. Абдуллаходжаева М.С., Крахмалев В.А., Хакбердиева Д.М., Бова Е.В. Цитологическая экспресс-диагностика рака шейки матки // Медицинский журнал Узбекистана. — 2007. — № 5. — С. 50–53.
2. Абдуллаходжаева М.С., Турсунов Х.Э., Крахмалев В.А., Хакбердиева Д.М., Бова Е.В. Диагностика ранней стадии рака шейки матки / Труды Всероссийской юбилейной научно-практической конференции патологоанатомов с международным участием к 100-летию со дня рождения проф. П.Г. Подзолкова. Красноярск, 20–22 окт., 2008 г.
3. Абдуллаходжаева М.С., Турсунов Х.Э., Бова Е.В. Препараты исследования цитологических препаратов под инвертированным микроскопом «НЕОРНОТ-2» // Врач-аспирант. — 2011. — № 3.3(46). — С. 413–418.
4. Фрешини Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Пер. с 5-го английского изд. д-ра биол. наук Ю.Н. Хомякова. — М.: Бинум. Лаборатория знаний, 2010.
5. Berridge M.V., Herst P.M., and Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // *Biotechnology Annual Review*. — 2005. — Vol. 11. — P. 127–152.
6. Jump U.P., Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture // *Cancer Communications*. — 1991. — Vol. 3(7). — P. 207–212.

STUDY OF THE NATURE OF DISPERSED LUMINESCENT PARTICLES OF CANCER CELLS

M.S. ABDULLAHODZHAEVA², A.R. FATTAHOV², Z.S. HASHIMOVA¹,
K.A. KAHAROVA¹, N.J. SAGDIEV¹

¹ Acad. A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences,

² Republican Pathology Center, Tashkent, Republic of Uzbekistan

In cultured HeLa cells were discovered the dispersed luminescent particles under polarized light, that were previously found in patients with diagnosis cervical cancer. The effect of anticancer drugs with different mechanisms of action on such particles was studied.

Keywords: dispersed luminescent particles, cervical cancer, anticancer drugs.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ В УНИВЕРСИТЕТАХ МОСКВЫ

Е.А. ГЛАДКОВ*

Институт физиологии растений РАН, Московский государственный машиностроительный университет

В последние годы подготовка биотехнологов в связи с переходом на новые ФГОС ВО и реорганизацией вузов существенно изменилась. На данный момент в Москве в ряде университетов существуют кафедры биотехнологической направленности. Каждая кафедра имеет свою специфику и традиции в подготовке студентов. Все биотехнологические кафедры вносят значительный вклад в развитие биотехнологии в России. Для многих кафедр характерна определенная специализация: многие кафедры специализируются на исследованиях в области медицинской биотехнологии, ряд кафедр специализируется на биотехнологии микроорганизмов. В связи с реорганизацией вузов ощущается нехватка в подготовке специалистов широкого профиля в области биотехнологии и в областях экологической и промышленной биотехнологии.

Ключевые слова: биотехнология, образование, московские университеты.

Биотехнология является одним из приоритетных направлений науки и техники. В Москве ряд университетов проводит подготовку по направлению «Биотехнология» и смежным направлениям, в учебных программах присутствуют дисциплины, связанные с биотехнологией. В течение многих лет в Москве специалистов в области биотехнологии готовил ряд университетов, среди которых Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Московский государственный университет инженерной экологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Московский государственный университет тонких химических технологий, Московский государственный университет пищевых производств, Московский государственный университет прикладной биотехнологии. Каждый из университетов при подготовке студентов имел свои традиции и вносил значительный вклад в подготовку специалистов-биотехнологов.

При этом кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология» факультета экологии и природопользования Московского государственного университета инженерной экологии готовила специалистов по специальности «Охрана окружающей среды и рациональное

использование природных ресурсов» со специализацией «Биотехнологическая защита окружающей среды», а кафедра «Сельскохозяйственная биотехнология» РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева готовила специалистов по специальности «Селекция и генетика сельскохозяйственных культур» по специализации «Биотехнология растений», затем данные кафедры перешли к подготовке студентов по специальности «Биотехнология». В Московском государственном университете тонких химических технологий существовал факультет биотехнологии и органического синтеза, биотехнологов готовили по различным специализациям (технология белковых и биологически активных веществ; технология биоорганического синтеза; технология лекарственных препаратов; экобиотехнология) [3]. На кафедре биотехнологии и бионанотехнологии среди основных учебных дисциплин имеются и такие:

- общая биология и биотехнология;
- теоретические основы биотехнологии; прикладная молекулярная биология;
- конструирование лекарственных и диагностических препаратов;
- строение и функции белков и нуклеиновых кислот; белковая инженерия;
- компьютерное моделирование в биотехнологии.

Московский государственный университет прикладной биотехнологии был крупным учебным и научным центром Российской Федерации по образованию в области прикладной биотехнологии, химии пищи, биологической безопасности пищевых продуктов животного происхождения, здорового питания [7].

© 2016 г. Гладков Е.А.

* **Автор для переписки:**

Гладков Евгений Александрович

канд. биол. наук, доцент кафедры «Биотехнология» Московского государственного машиностроительного университета (МАМИ); сотрудник отдела биологии клетки и биотехнологии лаборатории «Генетика культивируемых клеток» Института физиологии растений РАН

В последние годы подготовка биотехнологов в связи с переходом на новые ФГОС ВО и реорганизацией вузов существенно изменилась. Московский государственный университет прикладной биотехнологии был присоединен к Московскому государственному университету пищевых производств. Московский государственный университет тонких химических технологий вошел в состав Московского технологического университета. Московский государственный университет инженерной экологии был присоединен к Университету машиностроения (МАМИ). Перечисленные события оказали существенное влияние на биотехнологическое образование.

Ранее направление биотехнология относилось к укрупненной группировке направлений «Химические и биотехнологии», теперь в связи с переходом на ФГОС ВО 3+ поколения направление относится к группе «Промышленная экология и биотехнологии».

На данный момент в Москве в ряде государственных университетов существуют кафедры биотехнологической направленности. Каждая кафедра имеет свою специфику и традиции в подготовке студентов.

В 1968 году в Московском институте химического машиностроения (МИХМ) была создана кафедра «Машины и аппараты микробиологических производств» (с 1985 г. «Биотехника»), с 1999 г. — это кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология» в связи с частичным изменением направления вуза и переименованием его в МГУ инженерной экологии [8]. На кафедре «Экологическая и промышленная биотехнология» Московского государственного университета инженерной экологии, который был присоединен к Университету машиностроения, удавалось успешно реализовывать модель подготовки специалистов широкого профиля, обладающих знаниями в областях общей, экологической и промышленной биотехнологии и охраны окружающей среды. Были достигнуты успехи в экологической и промышленной биотехнологии и фитотехнологии, преподавались авторские курсы (общая экология, экология, экологическая биотехнология, биотехнологическая очистка сточных вод, биологическая переработка отходов и защита атмосферы, фитотехнология и фитобиотехнология, фитотехнологии для охраны окружающей среды, фотобиосинтез, биогеотехнология, генетика и генетическая инженерия, общая биотехнология, оборудование биотехнологических производств, биотехнологические производства, экологические проблемы биотехнологических производств, проектирование биотехнологических производств, физиология человека, культивирование клеток растений, животных и человека, экологическая микробиология, техническая

микробиология, химия БАВ, иммунобиотехнология, генеральное планирование и другие дисциплины). Вышел ряд учебных пособий, предназначенных для специалистов в области биотехнологии и охраны окружающей среды [17, 18]. Студенты проходили практику и выполняли дипломные работы в одних из ведущих институтов РАН по биотехнологии — Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, в лаборатории генетики культивируемых клеток Института физиологии растений РАН имени К.А. Тимирязева, а также в ООО «Бигор-сервис», ООО «БИОМИХМ» и др. Однако на данный момент из-за реорганизации кафедра изменила свое название на «Биотехнология» и, к сожалению, произошли значительные изменения учебного плана.

Кафедра биотехнологии Российского химико-технологического университета была создана в 1976 году. В то время микробиологические производства, технологии с использованием биосинтеза и биокатализа начали активно развиваться, поэтому возникла острая потребность в подготовке высококвалифицированных специалистов — инженеров-биотехнологов [13].

Сейчас кафедра реализует следующие образовательные программы:

- Промышленная биотехнология и биоинженерия.
- Молекулярная и клеточная биотехнология.
- Экологическая биотехнология.

Среди преподаваемых дисциплин на этой кафедре — биофизическая химия, биокинетика, экология, общая биология и микробиология, прикладная молекулярная биология, основы энзимологии, теоретические основы биотехнологии, основы проектирования и оборудование предприятий биотехнологической промышленности, пищевая биотехнология, медицинская биотехнология, современные проблемы биотехнологии, технология ферментных препаратов, экобиотехнология, молекулярная генетика, генная и белковая инженерия, молекулярные основы иммунологии, основы молекулярной медицины [13]. Для повышения уровня подготовки и квалификации выпускников кафедрой созданы учебно-научные центры «Геномика, молекулярная биотехнология и медицина» (совместно с Институтом молекулярной генетики РАН).

Кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства (создана путем соединения кафедр генетики, биотехнологии, а затем селекции и семеноводства) на факультете агрономии и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева выпускает бакалавров по направлению «Биотехнология», в магистратуре реализуется образовательная программа по направлению «Агрономия»: биотехнология (генетика, биотехнология и селекция). С

2010 года на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства проводится Международная Московская летняя школа молодых ученых «Биотехнологии в сельском хозяйстве, AgroBioTech» [14, 15].

Кафедра генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, в первую очередь, среди биотехнологических направлений специализируется на исследованиях в области сельскохозяйственной биотехнологии. Среди исследований:

1. Технология клонального микроразмножения.
2. Генетическая трансформация сельскохозяйственных культур.
3. Создание модульных векторов для клонирования целевых генов и регуляторных элементов с целью обеспечения стабильной и эффективной экспрессии гетерологичных генов.
4. Разработка технологии получения гаплоидных и дигаплоидных растений зерновых и овощных культур *in vitro*.
5. Оздоровление посадочного материала методами биотехнологии.
6. Создание банка растений *in vitro*.
7. Культура изолированных зародышей *in vitro*.
8. Тестирование новых регуляторов роста и БАВ.
9. Клеточная селекция растений на устойчивость к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды.
10. Получение веществ вторичного метаболизма и др.

Кафедра биотехнологии и промышленной фармации Московского технологического университета готовит инженеров-технологов фармацевтического, биомедицинского и биотехнологического направления [16].

Кафедра биотехнологии в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова была создана 7 июня 2010 года [11]. Кафедра является выпускающей по направлению «Биотехнология». Основные направления работы связаны с медицинской биотехнологией (терапевтические системы на основе биологически активных соединений растительного происхождения; противоопухолевые вакцины на основе белков теплового шока; средства ангиогенной биотерапии патологий и др.) [11].

Кафедра иммунологии и биотехнологии создана на базе объединения кафедр иммунологии и биотехнологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина [9]. Кафедра является выпускающей по специальности «Биотехнология» (бакалавр и магистр). На кафедре имеются учебно-научные лаборатории: ПЦР, ИФА, гематологии, иммунобиотехнологии. Основные научные

биотехнологические исследования студентов направлены на оптимизацию процессов культивирования микроорганизмов, разработку и испытание новых биологических препаратов лечебно-профилактического назначения, новых дезинфицирующих средств [9].

Кафедра «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств образована в 2013 году путем объединения трех кафедр: «Биотехнология», «Органическая, пищевая и биохимия» и «Продукты биоорганического синтеза» [10]. Кафедра готовила инженеров в рамках специальности «Биотехнология» по 3 специализациям:

- Технология ферментных препаратов.
- Технология биоконверсии растительного сырья.
- Технология белков и биологически активных веществ.

С 2001 года кафедра осуществляла подготовку инженеров по специальности «Пищевая биотехнология». С 2011 г. проводит подготовку бакалавров по направлению «Биотехнология», профили «Биотехнология» и «Пищевая биотехнология».

Ряд кафедр университетов выпускает студентов по другим направлениям, но с биотехнологическим профилем.

Кафедра биотехнологии МГУ выпускает специалистов по образовательным программам «Биоинженерия и менеджмент научных исследований и высоких технологий» и «Нанобиотехнология» [6]. Проводятся практики: биотехнология растений с основами генной инженерии, молекулярные методы анализа генома, современные методы секвенирования. Практикумы проводятся на базе Центра «Биоинженерия» и РНЦ «Курчатовский институт». В магистратуре на биологическом факультете МГУ проводится набор по направлению «Биология» на группу образовательных программ «Биоинженерия, биотехнология и биоэкономика», «Нанобиотехнология» [2].

Биотехнологический факультет в МГУ им. М.В. Ломоносова был создан в 2013 году. В учебный план включен ряд специальных дисциплин биотехнологического профиля (изучение общей биотехнологии, промышленной микробиологии и биотехнологии, молекулярной и клеточной биотехнологии, медицинской биотехнологии, кинетики биотехнологических процессов и др.), технического профиля (изучение прикладной физики, инженерной графики, процессов и аппаратов биотехнологических производств и др.), экономического и правового профиля (изучение экономики биотехнологической отрасли, защиты интеллектуальной собственности и др.). Следует отметить, что обучение на этом факультете осуществляется в бакалав-

риате по направлению подготовки «Биология» (профиль «Общая и прикладная биотехнология») [12]; открылось направление «Биотехнология» на договорной основе [1], в магистратуре по направлению подготовки «Биология».

На некоторых кафедрах университетов присутствуют дисциплины, связанные с биотехнологией.

Кафедра молекулярной биологии и медицинской биотехнологии была создана в 1990 году в составе отделения биохимии медико-биологического факультета на базе Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Минздрава России, она осуществляет чтение спецкурса «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской биотехнологии» [5].

На кафедре «Физиология растений» МГУ в течение многих лет осуществляется преподавание дисциплин, связанных с биотехнологией растений (спецкурс в бакалавриате «Биология растительной клетки *in vitro*» и ряд дисциплин в магистратуре совместно с Институтом физиологии растений РАН) [4].

Таким образом, специфика исследований большинства кафедр определяется научными интересами вузов. Все биотехнологические кафедры вносят значительный вклад в развитие биотехнологии в России. Для большинства кафедр характерна определенная специализация, многие кафедры специализируются на исследованиях в области медицинской биотехнологии, ряд кафедр специализируются на биотехнологии микроорганизмов. В связи с реорганизацией вузов и кафедр ощущается нехватка в подготовке специалистов широкого профиля в области биотехнологии и в областях экологической (с дополнительными фундаментальными знаниями по экологии и охране окружающей среды) и промышленной

биотехнологии. Кроме того, учитывая новые стандарты возможно включение большего количества и объема биотехнологических дисциплин в учебные планы, что позволит подготовить специалиста, хорошо разбирающегося в различных направлениях биотехнологии.

Литература

1. http://cpk.msu.ru/files/2016/kcp_2.pdf.
2. http://cpk.msu.ru/files/2016/kcp_3.pdf.
3. <http://old.mitht.ru/pages/87>.
4. <http://plantphys.bio.msu.ru/especial/especial.html>.
5. <http://rsmu.ru/>.
6. <http://www.bio.msu.ru/dict/view.php?ID=7>.
7. http://www.cmpk.ru/info/vse_voyzi_moskvi/spisok_voyzov/mgupb/.
8. <http://www.mami.ru/index.php?id=1802>.
9. <http://www.mgavm.ru/facultas/vbf/kafedras/biotechnology/>.
10. <http://www.mgupp.ru/obuchayushchimsya/instituty-i-kafedry/bitpbs/history.php>.
11. <http://www.mma.ru/education/faculties/pharm/cath/biotech/employees/>.
12. <http://www.msu.ru/info/struct/dep/biotech.html>.
13. <http://www.muctr.ru/univsubs/infacol/ekolog/faculties/f3/>.
14. <http://www.plantgen.com/>.
15. <http://www.timacad.ru/faculty/agro/>.
16. <https://chemtech.mirea.ru/department/office-of-science-intensive-chemical-technologies/btpr/>.
17. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Фитотехнологии для охраны окружающей среды: Учебное пособие. — М.: МГУИЭ, 2012. — 202 с.
18. Глушецкая Л.С., Гладков Е.А. Генеральный план и основные строительные решения промышленных производств: Учебное пособие. — М.: МГУИЭ, 2011. — 56 с.

BIOTECHNOLOGY EDUCATION AT THE UNIVERSITIES OF MOSCOW

E.A. GLADKOV

Institute of Plant Physiology RAS, Moscow State Engineering University

In recent years, training biotechnologists in connection with the transition to the new federal state educational standards of higher education and reorganization of universities has changed significantly. Currently, in Moscow there are a number of universities chairs of biotech orientation. Each department has its own peculiarities and traditions in the training of students. All the departments of biotechnology make a significant contribution to the development of biotechnology in Russia. For many departments are characterized by a certain specialization: many of the departments specialize in research in the field of medical biotechnology, a number of departments specializing in microbial biotechnology. In connection with the reorganization of high schools there is a lack in the preparation of broad specialists in the field of biotechnology in the areas of environmental and industrial biotechnology.

Keywords: biotechnology, education, Moscow universities.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

И.Г. МОРГУНОВ^{1,2}, Э.Г. ДЕДЮХИНА¹, С.В. КАМЗОЛОВА^{1*}, Т.И. ЧИСТЯКОВА¹,
Ю.Н. ЛУНИНА¹, А.А. МИРОНОВ¹, Н.Н. СТЕПАНОВА^{1,2},
О.Н. ШЕМШУРА³, М.Б. ВАЙНШТЕЙН^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,

²ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественнонаучный институт,
г. Пушкино Московской области, Россия;

³РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы, Республика Казахстан

Защита растений от наиболее опасных возбудителей болезней и вредных организмов в России осуществляется практически на 99% фунгицидами. Негативные последствия от применения химических препаратов общеизвестны — это загрязнение окружающей среды, а также сельскохозяйственной продукции остатками химических препаратов, включающих в себя тяжелые металлы, нитраты и другие соединения, опасные для здоровья людей. Основной тенденцией в мировой науке в области защиты растений является сокращение использования ядохимикатов и замена их на биологически безопасные препараты. В настоящем обзоре обобщены имеющиеся в литературе данные об использовании органических кислот (арахидоновой, лимонной, изолимонной, янтарной, пальмитолеиновой и др.) в качестве средств защиты растений, а также представлен анализ современных технологий их микробиологического производства.

Ключевые слова: защита растений, метаболиты микроорганизмов, органические кислоты, элиситор, биотехнологии.

Современное состояние исследований по использованию биопрепаратов для защиты растений

В мировой практике основными тенденциями в области биологических методов защиты растений являются: а) разработка биопрепаратов на основе бактерий, вызывающих заболевания насекомых-вредителей; б) разработка биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов; в) применение бактериофагов — вирусов бактерий, их естественных паразитов и регуляторов микробных популяций; г) разработка биопрепаратов на основе энтомопатогенных нематод. Существуют также немногочисленные разработки биопрепаратов на основе

бацилл с фунгицидными свойствами; однако применение бацилл в природных условиях ограничивает активность биопрепарата периодом до образования спор. В настоящее время активные исследования по биологической защите растений проводятся в США, странах Европейского союза, Бразилии, Индии, Китае, Мексике, Египте, ЮАР, Израиле. Более 75% мирового производства биопрепаратов приходится на США и страны Европы. В Европе в 2010 году продажная стоимость биопрепаратов на основе бактерий, вирусов и грибов составила 42 миллиона евро (Glare et al. 2012) [24].

В Российской Федерации создание и применение биологических средств защиты растений в связи с серьезным отставанием от мирового уровня отнесены к приоритетным направлениям развития науки. Научное обеспечение в области разработки биопрепаратов для защиты растений активно развивается в ФИЦ «Биотехнология», Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Институте биофизики СО РАН, Новосибирском аграрном университете, Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова, Всероссийском НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, Всероссийском институте защиты растений и др. Однако следует отметить, что широкое внедрение

© 2016 г. Моргунов И.Г., Дедюхина Э.Г., Камзолова С.В., Чистякова Т.И., Лунина Ю.Н., Миронов А.А., Степанова Н.Н., Шемшюра О.Н., Вайнштейн М.Б.

* Автор для переписки:

Камзолова Светлана Владиславовна

кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

142290 Пушкино, пр-т Науки, 5

E-mail: kamzolova@rambler.ru

в практику биопрепаратов на основе бактерий, грибов и вирусов ограничивается сложностью культивирования, высокой стоимостью препаратов, узкой областью применения. Биопрепараты на основе микроорганизмов не справляются с резкими всплесками заболеваний растений, возникающими при неблагоприятных условиях.

Новейшим направлением исследований является применение метаболитов микроорганизмов: индукторов (элиситоров) защитных систем растений; регуляторов роста; соединений, обладающих бактерицидными, фунгицидными и нематоцидными свойствами. Известно, что способностью индуцировать защитные реакции растений обладает целый ряд микробных метаболитов (белки, гликопротеины, олигосахариды, глюконы, органические кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты) (Bostock et al., 1981 [17]; Озерецковская, 1994 [11]; Озерецковская и др., 1994 [12]; Kamzolova et al., 2014a [34]). Большим преимуществом метаболитов микроорганизмов по сравнению с химическими средствами защиты растений является их экологическая безопасность.

Использование органических кислот для защиты растений

Известно, что органические кислоты обладают свойством стимулировать иммунитет растений к фитопатогенам, то есть характеризуются «элиситорной» активностью (Bostock et al., 1981 [17]; Озерецковская, 1994 [11]; Озерецковская и др., 1994 [12]). Термин «элиситор» был предложен для обозначения метаболитов фитопатогенов, которые индуцируют в растениях комплекс защитных реакций. Показано, что чрезвычайно высокой элиситорной активностью характеризуется арахидоновая кислота (АК). Найдено, что АК (5,8,11,14-дизайкозатетраеновая кислота) благодаря высокой физиологической активности находит широкое применение в медицине, фармакологии, косметике и диетологии (Ward, Singh, 2005) [47]. Использование АК в сельском хозяйстве в качестве стимулятора устойчивости растений к фитопатогенам является чрезвычайно перспективным, но еще недостаточно широко используемым приемом. Важно отметить, что АК не ингибирует прорастание зооспор и микроколоний гриба-возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*, но индуцирует в тканях растения целый комплекс защитных реакций: 1) восстановление механически поврежденных тканей растения; 2) синтез фитоалексинов (растительных антибиотиков); 3) накопление в тканях ингибиторов протеаз; 4) образование активных форм кислорода (Озерецковская, 1994) [11].

Детальные исследования, проведенные в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, показали, что элиситорная активность АК существенно зависит от концентрации кислоты (Озерецковская, 1994 [11]; Озерецковская и др., 1994 [12]). Высокие концентрации АК (5×10^{-5} М и выше) индуцируют некроз тканей картофеля и синтез фитоалексинов, которые накапливаются в некротизированных тканях в токсичных для патогена концентрациях, вызывая защитный эффект на растение. Однако через неделю, когда фитоалексины исчезают, ткани снова становятся чувствительными к патогенам. Таким образом, защитный эффект высоких концентраций АК является локальным и кратковременным. При обработке картофеля низкими концентрациями АК (10^{-7} – 10^{-8} М) некроза тканей и синтеза фитоалексинов не происходит, но ткани приобретают способность быстро мобилизовать весь комплекс защитных реакций в ответ на последующее инфицирование патогеном. Данный тип устойчивости получил название «индуцированной устойчивости» или «иммунизации» (Озерецковская, 1994 [11]; Озерецковская и др., 1994 [12]). Было обнаружено, что клубни картофеля, обработанные низкими концентрациями АК (10^{-7} М) и затем инфицированные *P. infestans*, становились устойчивыми к патогену в течение недели и затем сохраняли это свойство 2–3 месяца. Установлено, что устойчивость картофеля к фитофторозу, индуцированная низкими концентрациями АК, была длительной и обнаруживалась не только на обработанных участках, но распространялась по всем тканям, то есть носила системный характер (Озерецковская, 1994 [11]; Озерецковская и др., 1994 [12]). Следует подчеркнуть, что клубни картофеля, обработанные АК, приобретали устойчивость не только к *P. infestans*, но и к другим фитопатогенам, а также к механическим повреждениям. Метод индуцирования устойчивости растений препаратами, содержащими АК, был опробован в полупроизводственных условиях в течение 14 лет в различных регионах страны на различных сортах картофеля и томатов (Озерецковская, 1994) [11]. С помощью препарата, содержащего АК, удалось индуцировать устойчивость вегетирующих растений и клубней картофеля не только к *P. infestans*, но и к *Macrosporium solani*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Actinomyces scabes*, *Pectobacterium phytophthorum*. Прибавка урожая в результате обработки элиситором в зависимости от сорта, инфекционного фона, условий вегетационного сезона и числа обработок колебалась от 10 до 40%. Урожай не содержал вредных веществ (Озерецковская, 1994 [11]; Озерецковская и др., 1994 [12]).

Было показано, что обработка семян томатов низкими концентрациями АК (0,001, 0,01 и 0,1 мкг/мл) в течение 24 ч снижала развитие комплекса болезней (макроспориоз, септориоз, черная бактериальная пятнистость) в 1,9–5,5 раз и повышала урожай на 10–35% (Иванюк и др., 1990) [8].

В качестве элиситора защитных реакций растений нами был предложен препарат, представляющий смесь этиловых эфиров жирных кислот с высоким содержанием АК, выделенных из мицелия гриба *Mortierella hygrophila* (Eroshin, Dedyukhina, 2002 [21]; Dedyukhina et al., 2014 [19, 20]; Дедюхина и др., 2016 [6]). Испытания, проведенные в лабораторно-тепличных условиях, показали, что препарат снижает развитие фитофтороза томатов и ризоктониоза картофеля по сравнению с контролем (без обработки) в 3,4 и 5 раз с биологической эффективностью 71 и 80%, соответственно (Дедюхина и др., 2016) [6]. Полевые испытания препарата АК из *M. hygrophila*, проведенные на площади 3 га, показали, что двукратная обработка ботвы картофеля снижала развитие фитофтороза, парши обыкновенной и ризоктониоза по сравнению с необработанными растениями на 70, 35 и 54%, соответственно, и повышала урожай на 11–12% по сравнению с контролем (обработка фунгицидами) (Eroshin, Dedyukhina, 2002) [21]. Испытания препарата АК, проведенные на площади 400 га продемонстрировали также его эффективность против церкоспороза сахарной свеклы (Eroshin, Dedyukhina, 2002) [21].

Следует отметить, что практическое применение элиситоров для защиты растений требует соблюдения ряда условий (Озерецковская, Васюкова, 2002) [13]:

1) подбор оптимальной концентрации элиситора, поскольку высокие концентрации препарата приведут к возникновению некроза и синтезу фитоалексинов, что связано с затратами энергии и ослаблением растений;

2) диапазон оптимальных концентраций элиситора очень узок и зависит как от вида сельскохозяйственной культуры, так и от фазы вегетации;

3) эффективность элиситора снижается при высоком инфекционном фоне (эпифитотии); в этом случае необходимо неоднократное использование препарата;

4) рабочие растворы элиситора не должны содержать примесей иммуносупрессоров.

В последние годы публикуется все больше данных об антимикробном потенциале лимонной кислоты (ЛК), янтарной кислоты (ЯК), α -кетоглутаровой кислоты (КГК) и пальмитолеиновой кислоты (ПОК). ЛК тормозит рост фитопатогенных грибов *Colletotrichum*, которые вызывают антракноз (болезнь огурцов и бахчевых

культур) (Kang et al., 2003) [37]. ЯК ингибирует рост бактерий *Erwinia carotovora* (возбудитель черной ножки (мягкой гнили) картофеля) и грибов *Penicillium casei* (возбудитель пенициллеза — голубой гнили); обладает ярко выраженной нематоцидной активностью: после 72-часовой выдержки с ЯК летальность особо губительных для картофеля фитопаразитических стеблевых нематод *Ditylenchus destructor* составляла около 60% (Kamzolova et al., 2014a) [34]. КГК угнетает рост грибов *Fusarium napiforme* и фитопаразитических стеблевых нематод *Ditylenchus destructor* (Камзолова и др., 2016) [9]. Этиловые и метиловые эфиры ПОК обнаруживают высокую антимикробную активность в отношении таких патогенов, как *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* (Huang et al., 2010) [25]. Бактерицидная активность ПОК и ее метиловых эфиров в отношении *S. mutans*, (90–100% ингибирование) проявлялась при очень низких концентрациях (2,5–25,0 мкг/мл) (Huang et al., 2010) [25]. Биологическую активность ПОК исследовали в опытах по получению трансгенных растений баклажанов с чрезвычайно высоким содержанием ПОК, которые характеризовались повышенной устойчивостью к *Verticillium*, возбудителю вертициллезного увядания (вилта) (Xing, 2001) [48].

В последние годы активно исследуются органические кислоты как стимуляторы (фитогормоны) роста растений. Хорошо известно, что ЯК и КГК являются сигнальными веществами, связывающими энергетическую и гормональную системы растений; (Кондрашова, 2002) [10]. ЯК легко всасывается при замачивании семян, а при опрыскивании поступает в растения через листья, регулируя энергетический обмен. Действие ЯК проявляется уже в очень низких концентрациях. Передозировка препарата не опасна, поскольку его избыток используется растением и микроорганизмами как продукт питания. Препарат стабилизирует жизнедеятельность естественной микрофлоры почвы, что особенно важно для восстановления плодородия и очистки участков, загрязненных токсичными органическими веществами. Препарат повышает устойчивость растений к воздействию неблагоприятных факторов (засуха, холод, избыток или недостаток влаги, недостаточная освещенность), снижает заболеваемость растений, повышает содержание в листьях хлорофилла, что проявляется в более существенном увеличении урожайности. Под воздействием растений и микроорганизмов ЯК разлагается на воду и углекислый газ, то есть идеально и экологически чисто утилизируется. Препарат обеспечивает увеличение

урожайности корнеплодов до 20%, огурцов — до 40%. В растениях и плодах повышается содержание биологически ценных веществ, снижается содержание нитратов. Применение смеси карбоновых кислот (ЛК, КГК, ЯК и др.) обеспечивает прибавку урожая картофеля (до 43%) и улучшение качества клубней картофеля (по сухому веществу и крахмалу) (Верещагин и др., 2010) [2].

Узким местом на пути внедрения этих простых, нетоксичных и доступных по цене препаратов представляется отсутствие не только в России, но и в мире производства названных органических кислот необходимого качества, природного конформерного и изомерного состава и стоимости. Во многих странах существует даже запрет на использование в сельском хозяйстве и пищевой промышленности препаратов, производимых химическим синтезом. Известно, что даже небольшие примеси в препаратах резко снижают качество и даже являются клеточными ядами для растений и животных.

Альтернативой химическому синтезу являются биосинтетические процессы получения органических кислот. Эксперты Технологической платформы «Биоиндустрия и биоресурсы — БиоТех2030» прогнозируют, что к 2030 году до 30–35% продукции химической отрасли будет производиться либо полностью биотехнологическим способом, либо с использованием элементов биотехнологий. Пять кислот (лимонная, глюконовая, итаконовая, молочная и уксусная) уже производятся во многих развитых странах мира микробным синтезом в больших количествах (сотни тысяч — миллионы тонн в год), имеют пищевое и техническое назначение.

Ниже представлен анализ существующих методов получения АК, ЛК, ЯК, КГК и ПОК, перспективных соединений для разработки экологически чистых препаратов защиты растений от наиболее опасных возбудителей болезней и вредных организмов.

Методы получения органических кислот

Арахидоновая кислота

Основными природными источниками АК являются печень и надпочечник животных, а также желток куриных яиц, однако содержание АК в них очень мало (менее 10% от сухой массы). Ограниченность природных источников АК, а также возрастающая потребность в данной физиологически активной кислоте, главным образом, в медицине, фармацевтике и диетическом питании диктуют необходимость развития ее микробиологического производства с использованием высокоэффективных

штаммов-продуцентов и дешевых, возобновляемых углеродных субстратов.

Наиболее перспективными продуцентами АК считаются мицелиальные грибы, относящиеся к роду *Mortierella* (класс *Phycomycetes*, подкласс *Zygomycetes*, семейство *Mortierellaceae*) (Ward, Singh, 2005 [47]; Дедюхина и др., 2011 [4]). Разработан микробиологический метод селекции мицелиальных грибов-продуцентов АК, основанный на использовании ацетилсалициловой кислоты в качестве ингибитора метаболизма АК (Ерошин и др., 1996) [7]. Этот метод был использован для селекции штаммов *Mortierella alpina*, продуцентов АК (Ерошин et al., 1996) [22]. Согласно имеющимся в литературе данным, представители указанного вида непатогенны, не образуют микотоксинов и потенциально аллергенных спор в условиях глубокой ферментации (Streekstra, 1997) [45].

В настоящее время процессы получения АК с использованием различных штаммов грибов рода *Mortierella* запатентованы в Европе, Китае, Японии и США. Промышленное производство микробных липидов с высоким содержанием АК (40–70%) осуществляется в Италии и Китае.

В известных процессах микробиологического получения АК в качестве углеродного субстрата обычно используют углеводы. Однако для снижения себестоимости производства АК существенное значение имеет использование дешевых и возобновляемых углеродных субстратов. В последние годы глицерин и глицеринсодержащие отходы производства биодизеля рассматриваются в качестве перспективных субстратов для микробиологических процессов (Василов, 2007 [1]; Дебабов, 2008 [3]). Как показали наши исследования, образование АК у штаммов *M. alpina* LPM-301 и NRRL-A-10995 в подобранных оптимальных условиях на среде с глицерином достигало 40–43% от липидов (11–13% от биомассы) (Dedyukhina et al., 2012) [18]. Нами впервые было установлено, что селекционированные штаммы *M. alpina* способны использовать отходы производства биодизеля в качестве единственного источника углерода и энергии и синтезировать АК (15–20% от липидов) (Dedyukhina et al., 2014) [19, 20].

Как правило, при микробиологическом получении АК используется метод глубокого, периодического культивирования продуцентов, однако имеются данные об эффективности приема проточного культивирования грибов *M. alpina*, при котором питательная среда подается в ферментер с постоянной скоростью, а слив культуральной жидкости проводят периодически, по мере достижения установленного объема (Ерошин et al., 2000 [23]; Дедюхина и др., 2015 [5]).

Во многих процессах промышленного получения АК используется метод культивирования продуцентов с дробным внесением углеродного субстрата, который позволяет избежать катаболитной репрессии в присутствии высоких концентраций глюкозы. Имеются данные, что этанол стимулировал образование АК грибами (Jin et al., 2008) [26]. В частности, показано, что дробная добавка этанола к растущей культуре *M. alpina* ME-1 (3 и 2% на 5- и 7-е сутки роста, соответственно) повышала образование АК в 1,7 раза (до 19,8 г/л) (Jin et al. 2008) [26]. Высказывается предположение, что этанол, благодаря быстрому превращению в ацетил-КоА, обеспечивает дополнительный приток НАДФН, необходимого для липогенеза.

Анализ данных литературы показывает, что из физических факторов наибольшее влияние на синтез АК оказывает температура. Считается, что увеличение степени ненасыщенности жирных кислот в липидах мембран является адаптивной реакцией микроорганизмов на понижение температуры окружающей среды. Было установлено, что активности Δ -6 и Δ -5 десатураз, участвующих в синтезе АК, возрастают при снижении температуры и, следовательно, культивирование продуцентов при пониженной температуре способствует синтезу АК. Однако необходимо иметь в виду, что при понижении температуры может усиливаться синтез жирных кислот более ненасыщенных, чем АК.

Данные о влиянии pH на синтез АК противоречивы. Нами было показано, что синтез АК у штамма *M. alpina* LPM 301 чрезвычайно чувствителен к pH среды, оптимален при pH 6,0 и полностью ингибируется при pH 3,0. Высказано предположение, что при низких значениях pH происходит торможение активности (или синтеза) Δ -12 десатуразы, ответственной за превращение олеиновой кислоты в линолевую (Дедюхина и др., 2015) [5].

В ряде публикаций отмечается, что условия для роста грибов и синтеза АК различны. Поскольку синтез АК, как правило, происходит в стационарную фазу роста периодических культур, очень распространенным приемом является двухстадийное культивирование продуцентов, при котором в первую фазу устанавливаются режимы температуры, pH и аэрации, благоприятные для роста мицелия, а во вторую фазу — для синтеза АК (Jin et al., 2008 [26]; Дедюхина и др., 2015 [5]; Li et al., 2015 [39]). Обращает внимание тот факт, что у многих штаммов *M. alpina* доля АК в липидах возрастает в период стационарной фазы (при недостатке углеродного субстрата) за счет метаболизации других внутриклеточных жирных кислот (Eroshin et al., 2000 [23]; Jin et al.,

2008 [26]; Zhang et al. 2015 [50]). Было показано, что увеличение доли АК в липидах в стационарную фазу роста *M. alpina* происходит, главным образом, за счет синтеза арахидоновой кислоты *de novo*; в этот период, в условиях недостатка углеродного субстрата происходила активация цикла малат/пируват и шунта гамма-аминобутирата, что обеспечивало образование НАДФН, НАДН и промежуточных соединений, необходимых для АК синтеза (Zhang et al., 2015) [50]. Нами был разработан метод повышения доли АК в липидах *M. alpina* в 1,6–2,0 раз путем инкубирования мицелия в течение 4–7 суток при комнатной температуре (Dedyukhina et al., 2014) [19, 20].

Лимонная кислота (ЛК)

В настоящее время ЛК получают из свекловичной или тростниковой мелассы с использованием условно патогенных грибов *Aspergillus niger*. Содержание сахара в мелассе не превышает 50%, остальные 50% — это балластные вещества, которые не используются продуцентом и выбрасываются в окружающую среду. Также предусматривается обязательная обработка мелассы ферроцианидами для удаления избыточного содержания микроэлементов. Данный процесс производства ЛК является сложным и экологически небезопасным.

Как отмечается в обзорных статьях, наиболее перспективными продуцентами ЛК являются дрожжи *Yarrowia lipolytica* (син. *Saccharomycopsis lipolytica*, *Candida lipolytica*) (Финогенова с соавт., 2005 [15]; Rywińska et al., 2013 [44]). Их удобно культивировать в глубинных условиях, процессы культивирования легко масштабируются и автоматизируются.

Работы по биосинтезу ЛК у дрожжей *Y. lipolytica* в нашей стране были начаты еще в 1970-годы в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ) под руководством А.Б. Лозина и Т.В. Финогеновой и продолжаются по настоящее время. Сотрудниками института разработаны процессы получения ЛК у дрожжей *Y. lipolytica* при росте на разных субстратах: для технических нужд из *n*-алканов, глицеринсодержащих отходов (ГСО) производства биодизельного топлива; для пищевых и медицинских целей — из глюкозы, глицерина, этанола и растительных масел. Работы по изучению биосинтеза ЛК дрожжами *Y. lipolytica* ведутся также и за рубежом: во Вроцлавском университете (под руководством профессора В. Римовича), в Дрезденском технологическом университете (под руководством Г. Барта), в Лейпцигском институте изучения окружающей среды (под руководством профессора Штоттмейстера) и др.

В литературе широко представлены данные о физиологических основах сверхсинтеза ЛК дрожжами *Y. lipolytica*. В большинстве случаев ЛК получают, лимитируя рост микроорганизмов источником азота, фосфора, серы при избыточном содержании источника углерода (Финогенова с соавт., 2005 [15]; Rywińska et al., 2013 [44]). Синтез ЛК является трехфазным процессом. В первой фазе, начинающейся сразу после засева продуцента в свежую питательную среду, происходят активный рост культуры и потребление лимитирующего компонента среды; в это время ЛК практически не образуется. Интенсивный синтез ЛК начинается после исчерпания из среды лимитирующего компонента и перехода культуры в фазу замедленного роста и стационарную фазу роста и продолжается до тех пор, пока в среде присутствует источник углерода. Следует отметить, что источник углерода определяет преимущественное накопление ЛК или ее изомера — изолимонной кислоты (ИЛК). Нами было показано, что при культивировании на рапсовом масле природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 соотношение ЛК:ИЛК составляло 1,2:1 (Kamzolova et al., 2011a) [29], а при росте на глицерине этот штамм продуцировал преимущественно ЛК и соотношение цитрат/изоцитрат определяли как 7,5:1 (Kamzolova et al., 2011b) [30].

Как правило, при микробиологическом получении ЛК используются методы как глубинного периодического культивирования, так и непрерывного продолжительного синтеза ЛК в режиме рецикла и отъемов-доливов. Arzumakov et al. (2000) [16] разработали отъемно-доливной способ получения ЛК из этилового спирта, при котором активность продуцента сохранялась в течение длительного времени (более 700 ч). Нами было установлено, что при применении отъемно-доливного метода активный биосинтез ЛК из глицеринсодержащих отходов производства биодизельного топлива продолжался в течение более 500 ч (Kamzolova et al., 2015) [36]. В обзорной статье Rywińska et al. (2013) [44] имеется сообщение о продолжительном отъемно-доливном культивировании дрожжей *Y. lipolytica* в среде с ГСО производства биодизеля (в течение 1350 и 1680 ч для штаммов *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 и *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7, соответственно); при этом была достигнута высокая концентрация ЛК: 197 г/л у *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 и 176 г/л у *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31.

Анализ литературных данных показывает, что из физических факторов наибольшее влияние на синтез ЛК оказывают кислород. В ряде работ (Kamzolova et al., 2003 [27]; Morgunov et al., 2013a [40]) было продемонстрировано, что синтез ЛК прекращается при

низком обеспечении клеток кислородом. Оптимальная концентрация кислорода для биосинтеза из глицерина — 50% (от насыщения) (Morgunov et al., 2013) [40, 41]. Нами было обнаружено, что для дрожжей *Y. lipolytica*, культивируемых в среде с этанолом, необходимо поддерживать аэрацию 20–60% (от насыщения) (Kamzolova et al., 2003) [27]. Одной из причин прекращения экспрессии ЛК в условиях низкой аэрации является резкое снижение активности ряда митохондриальных ферментов: цитратсинтазы, аконитазы, малатдегидрогеназы и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, а также падение активности ключевых ферментов глиоксилатного цикла — изоцитратлиазы и малатсинтазы. С другой стороны, рост активности АТФ-цитратлиазы в условиях низкого обеспечения клеток кислородом и прекращение сверхсинтеза ЛК могли быть обусловлены переключением метаболизма — оттоком цитрата на процесс накопления внутриклеточных липидов. Кроме того, обнаружено, что потребности дрожжей *Y. lipolytica* в кислороде для синтеза ЛК определяются внутриклеточным содержанием железа. Способность дрожжей *Y. lipolytica* синтезировать ЛК проявлялась в условиях интенсивной аэрации среды (60% от насыщения) как при низком, так и при высоком содержании ионов железа; в условиях же недостатка кислорода (5–20% от насыщения) — только при высоком содержании ионов железа в биомассе.

Температура оказывает существенное влияние на процесс биосинтеза ЛК. Максимальный биосинтез ЛК у *Y. lipolytica* осуществляется при температуре 28–29 °С, и культивирование продуцентов при температуре ниже или выше оптимальной приводит к снижению кислотообразования (Morgunov et al., 2013) [40, 41].

Дрожжи *Y. lipolytica* способны окислять углеводороды в широком диапазоне рН (от 2,5 до 8). Нами было выявлено, что оптимальное значение рН среды для *Y. lipolytica* в среде с глицерином составляло 4,5–5,0, а при рН ниже 4,0 и выше 7,0 кислотообразование снижалось (Morgunov et al., 2013) [40, 41].

В таблице 1 представлены наиболее высокопродуктивные процессы по биосинтезу ЛК из различных субстратов с использованием дрожжей *Y. lipolytica*. С использованием *n*-алканов у природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 достигнут выход 102 г/л (142% от использованного субстрата), а с использованием мутантного штамма *Y. lipolytica*, полученного при обработке нитрозометилмочевинной, достигнут выход продукта 217 г/л (145%) (Финогенова и др., 2005) [15]. Недостаток вышеприведенных способов получения ЛК из жидких парафинов — их канцерогенность и, следовательно,

неприемлемость применения продукта в пищевой промышленности и медицине. Перспективным сырьем для разработки биотехнологических процессов получения ЛК пищевого, медицинского назначения и для использования в сельском хозяйстве являются сахара из зерна и сахарной свеклы и биоэтанол. Описан эффективный способ получения ЛК из глюкозы с использованием рекомбинантного штамма *Y. lipolytica* с суперэкспрессией гена пируваткарбоксилазы — достигнут выход продукта 95 г/л (75% от использованного субстрата) (Tan et al., 2016) [46]. Предложен способ получения ЛК из крахмала у мутанта *Y. lipolytica* AWG7 в режиме непрерывного культивирования с применением мембранного модуля; разработанный способ культивирования требует непрерывно удалять синтезированную ЛК, что особенно важно при его ингибирующем воздействии на продуцент в периодическом режиме; достигнут выход продукта 119 г/л (50% от использованного субстрата)

(Rywinska et al., 2013) [44]. С использованием этанола в режиме периодического культивирования у мутанта *Y. lipolytica* № 1 достигнут выход продукта — 120 г/л (87% от использованного субстрата) (Kamzolova et al., 2003) [27]. Недостаток способа получения ЛК из этанола — токсичность высоких концентраций этанола для клетки; отсутствие достаточных зерновых ресурсов и высокая себестоимость спирта (500–600\$ за тонну). С использованием очищенного глицерина и ГСО производства биодизельного топлива разработаны процессы получения ЛК в режимах периодического и непрерывного культивирования, достигнут выход продукта 122,2 г/л (95% от использованного субстрата) (Morgunov, Kamzolova, 2015) [42]. С использованием рапсового масла у мутанта *Y. lipolytica* NG40/UV7, полученного в результате обработки с нитрозогуанидином и УФ-облучением, достигнут выход 175 г/л (150% от использованного субстрата) (Kamzolova et al., 2011a) [29].

Таблица 1

**Микробиологические процессы получения ЛК
с использованием природных и мутантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica***

Продуцент	Субстраты	Условия	ЛК (г/л)	УЛК (%)	Ссылка
<i>Y. lipolytica</i> ВКМ Y-2373	н-алканы	периодическое культивирование	102	142	Финогенова и др., 2005 [15]
<i>Y. lipolytica</i> 187/1 (мутант)	н-алканы	периодическое культивирование	217	145	Финогенова и др., 2005 [15]
<i>Y. lipolytica</i> (рекомбинантный штамм)	глюкоза	периодическое культивирование с подпиткой	95	75	Tan et al., 2016 [46]
<i>Y. lipolytica</i> AWG7	крахмал	Recycle	119	50	Rywinska et al., 2013 [44]
<i>Y. lipolytica</i> 187/1 (мутант)	этанол	периодическое культивирование	120	87	Kamzolova et al., 2003 [27]
<i>Y. lipolytica</i> № 15 (мутант)	глицерин	периодическое культивирование с подпиткой	98	70	Kamzolova et al., 2011b [30]
<i>Y. lipolytica</i> NG40/UV7 (мутант)	глицерин	периодическое культивирование с подпиткой	115	64	Morgunov et al., 2013 [40, 41]
<i>Y. lipolytica</i> NG40/UV7 (мутант)	ГСО	периодическое культивирование с подпиткой	122,2	95	Morgunov, Kamzolova, 2015 [42]
<i>Y. lipolytica</i> NG40/UV7 (мутант)	рапсовое масло	периодическое культивирование с подпиткой	175	150	Kamzolova et al., 2011a [29]

Янтарная кислота (ЯК)

ЯК производится в России и за рубежом методами химического синтеза из малеиновой кислоты или ее ангидрида с использованием дорогостоящего катализатора ванадия. Известно, что малеиновая кислота и соединения ванадия являются клеточными ядами и даже небольшие их примеси резко снижают качество янтарной кислоты. Также для получения ЯК используется процесс термического разложения янтаря и его очистки путем многократной перекристаллизации; однако этот процесс является дорогостоящим.

В последние годы возрастает интерес к микробиологическому синтезу ЯК. Микробиологическое получение ЯК основано на использовании бактерий *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. С использованием глюкозы у *A. succiniciproducens* достигнут выход продукта 83 г/л (89% от использованного субстрата). Наивысшая продуктивность синтеза ЯК (146 г/л) достигнута с генетически модифицированным штаммом *C. glutamicum*, который выращивали при высокой плотности биомассы в условиях лимита кислорода с дробными добавками бикарбоната натрия и глюкозы (Okino et al., 2008) [43]. Следует отметить, что производство ЯК с использованием бактериальных штаммов имеет существенные недостатки: 1) одновременно с ЯК накапливаются в значительных количествах побочные продукты, такие как муравьиная, молочная, уксусная и другие кислоты; 2) получение ЯК с помощью бактерий — довольно дорогостоящий процесс, поскольку ферментация проходит при нейтральных значениях pH. Например, оптимум pH для роста *A. succinogenes* составляет 6,8, что требует добавления KOH, NaOH или других щелочей. Дополнительно внесенная щелочь реагирует с ЯК с образованием солей, количество которых превышает содержание свободной ЯК; следовательно, требуется дополнительная стадия подкисления среды перед выделением ЯК.

Более подходящими для производства ЯК являются дрожжевые продуценты.

В ИБФМ РАН разработан оригинальный двухстадийный процесс получения ЯК, который включают в себя биосинтез КГК дрожжами *Y. lipolytica* и ее дальнейшее окисление до ЯК под воздействием перекиси водорода. Схема процесса представлена на рисунке 1. Содержание ЯК в культуральной жидкости составило 63,4 г/л с выходом 75% от использованного этанола (Kamzolova et al., 2009) [28].

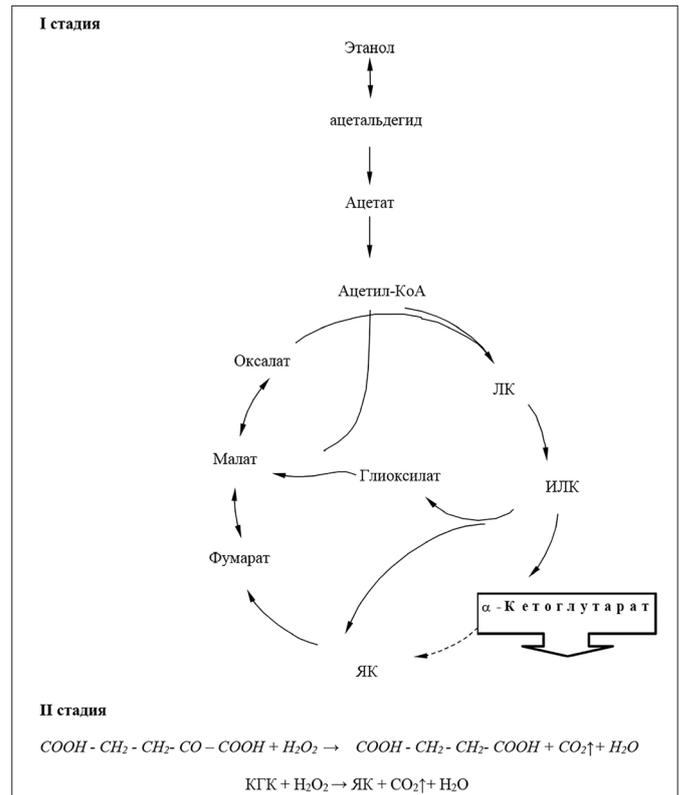


Рис. 1. Схема процесса получения ЯК, включающего в себя биосинтез КГК в ЦТК (I стадия) с помощью *Y. lipolytica* и ее дальнейшее окисление до ЯК в присутствии перекиси водорода (II стадия)

В таблице 2 представлены оптимизированные процессы получения ЯК и их характеристики. С использованием этанола достигнут выход продукта 71,7 г/л (70% от использованного субстрата) (Kamzolova et al., 2014a) [34]. В среде с n-алканами достигнут выход продукта 38,8 г/л (82% от использованного субстрата) (Kamzolova et al., 2012a) [31]. С использованием рапсового масла выход продукта составляет 69 г/л (89% от использованного субстрата) (Kamzolova et al., 2014b) [32]. ЯК выделена из культуральной жидкости; полученные препараты — гомогенные, со степенью очистки не менее 99,5%. Температура плавления препарата ЯК — 187–188 °С сопоставима с литературными данными (mp 185–191 °С, Fluka 2005/2006).

Исходя из предположения, что ЯК, образуемая в результате декарбоксилирования КГК перекисью водорода, может отличаться по своим биохимическим свойствам от ЯК, образуемой в ЦТК, проверили биологическую активность ЯК на основные функции митохондрий. В качестве образца (эталоны) применяли ЯК фирмы Sigma-Aldrich, обычно используемую в биохимических исследованиях. Сравнение двух препаратов выявило их идентичность по таким параметрам, как

АДФ-стимулируемое дыхание, дыхательный контроль (изменение скорости дыхания с изменением концентрации АДФ) и чувствительность к малонату — ингибитору дыхания митохондрий. Это означает, что ЯК как продукт, образуемый окислением КГК перекисью водорода, транспортируется в митохондрии и эффективно окисляется сукцинатдегидрогеназой (Kamzolova et al., 2009) [28].

Высокоэффективные процессы получения ЯК с использованием мутантных и рекомбинантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica* разрабатываются во ВНИИГе-

нетика. Описан процесс получения ЯК из глицерина у мутанта *Y. lipolytica* ВКПМ Y-3314 со сниженной активностью фермента сукцинатдегидрогеназы; выход продукта составил 45 г/л (36% от использованного субстрата) (Yuzbashev et al., 2010) [49]. Описан процесс получения ЯК из глюкозы с использованием мутанта *Y. lipolytica* ВКПМ Y-3753, полученного в результате многоступенчатого мутагенеза с использованием нитрозогуанидина, который синтезировал 60 г/л ЯК (Синеокий и др., 2013) [14].

Таблица 2

Способы получения ЯК, разработанные в ИБФМ РАН

Субстрат	Ферментация		Выделение		
	ЯК (г/л)	Выход (%)	Описание	Выход (%)	Чистота (%)
Этанол	71,7	70	белый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом	72	100
<i>n</i> -Алканы	38,80	82,45	белый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом	62	99,5
Рапсовое масло	69,0	95,0	белый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом	70	100

α-Кетоглутаровая кислота (КГК)

Во всем мире КГК производят путем химического синтеза. Исходным сырьем являются диэтиловый эфир янтарной и эфир щавелевой кислот.

В последние годы появились процессы получения КГК с помощью природных, мутантных и рекомбинантных штаммов дрожжей *Y. lipolytica*. В качестве источника углерода используют *n*-алканы, этиловый спирт, глицерин, растительные масла. В среде с жидкими парафинами у природного штамма *S. lipolytica* ВКМ Y-2402D достигнут выход 108,7 г/л (120% от использованного субстрата) (Финогенова и др., 2005) [15]. Немецким ученым с помощью методов геной инженерии удалось сконструировать мутант, содержащий мультикопийные гены α -кетоглутаратдегидрогеназы (KGD1, KGD2, LPD1), который продуцировал до 186 г/л КГК (Holz et al. 2011). Нам удалось разработать высокоэффективные процессы получения КГК из этанола и рапсового масла. В среде с этанолом у природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2412 достигнут выход 172 г/л (70% от использованного субстрата) (Kamzolova et al., 2012b) [32]. В среде с рапсовым маслом у природного штамма

Y. lipolytica ВКМ Y-2412 достигнут выход 106,5 г/л (95% от использованного субстрата) (Morgunov et al., 2013) [40, 41].

Пальмитолеиновая кислота (ПОК)

Природными источниками ПОК являются внутренней жир морских животных, куриный желток, жир норки, орехи макадамии, облепиха. С использованием методов генетической инженерии, селекции и оптимизации условий культивирования были созданы масляные культуры, накапливающие высокие концентрации пальмитолеиновой кислоты. Методами геной инженерии были активированы биосинтетические механизмы синтеза ПОК в *Arabidopsis thaliana* (резуховидка Таля), что позволяет рассматривать это растение как перспективное для промышленного использования. Однако низкая урожайность и слабые агрономические характеристики растений, потребность в значительных сельскохозяйственных площадях и зависимость от погодных условий ограничивают их коммерциализацию как источника получения ПОК.

В последние годы в качестве наиболее перспективного метода рассматривается микробиологический синтез ПОК. Обнаружено преобладание ПОК (28–42% от

суммы жирных кислот) в липидах грибов-зигомицетов порядка *Kickxellales*, показана стабильность этой характеристики при изменении условий культивирования и предложено использовать этот признак в качестве таксономического критерия. Имеются сведения, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *Candida krusei* способны накапливать большое количество ПОК (до 74% от липидов) (Kolouchova et al., 2015) [38].

Анализ данных литературы показывает, что в настоящее время процессы микробиологического получения пальмитолеиновой кислоты находятся в состоянии разработки.

В заключение следует подчеркнуть, что разработка технологий получения биологически активных карбоновых и жирных кислот как основы для создания средств защиты растений представляет несомненный научный и практический интерес и очень актуальна для нашей страны.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-08-00702.

Литература

1. Васильев Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1: Биодизель // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 47–54.
2. Верещинин А.А., Кропоткина В.В., Хмелева А.Н. О механизме ростстимулирующего действия сверхмалых доз природных органических кислот // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. — 2010. — № 1. — С. 46–48.
3. Дебабов В.Г. Биотопливо // Биотехнология. — 2008. — № 1. — С. 3–14.
4. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Вайнштейн М.Б. Биосинтез арахидоновой кислоты микромицетами (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2011. — Т. 47. — № 2. — С. 125–134.
5. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Миронов А.А., Камзолова С.В., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. Влияние рН, аэрации и температуры на синтез арахидоновой кислоты *Mortierella alpina* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 51. — № 2. — С. 4–7.
6. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Камзолова С.В., Миронов А.А., Моргунов И.Г., Вайнштейн М.Б. Исследование влияния препарата арахидоновой кислоты из мицелия *Mortierella hygrophila* на устойчивость томатов и картофеля к фитопатогенам // Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию: Междунар. науч.-практич. конф. — Алматы, 2016. — С. 213–216.
7. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желлифонова В.П., Ботаст Р.Дж. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты // Микробиология. — 1996. — Т. 65. — № 1. — С. 31–36.
8. Иванюк В.Г., Чалова Л.И., Юрганова Л.А., Озерецковская О.Л., Караваева К.А. Иммунизация томатов биогенными индукторами защитных реакций // Вестн. с.-х. науки. — 1990. — № 5. — С. 144–146.
9. Камзолова С.В., Самойленко В.А., Шемшурова О.Н., Бекмаханова Н.Е., Лунина Ю.Н., Аллаярлов Р.К., Степанова Н.Н., Моргунов И.Г. Способ получения α -кетоглутаровой кислоты из этанола с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию: Междунар. науч.-практич. конф. — Алматы, 2016. — С. 173–176.
10. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты // Вопр. биол. мед. фармац. химии. — 2002. — Т. 1. — С. 7.
11. Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений биогенными элиситорами фитопатогенов // Прикладная биохимия и микробиология. — 1994. — Т. 30. — № 3. — С. 325–331.
12. Озерецковская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И. Механизмы индуцирования элиситорами системной устойчивости растений к болезням // Физиология растений. — 1994. — Т. 41. — № 4. — С. 626–633.
13. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. При использовании элиситоров для защиты сельскохозяйственных растений необходима осторожность // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38. — № 3. — С. 322–325.
14. Синеев С.П., Соболевская Т.И., Лукина Г.П., Юзбашев Т.В., Юзбашева Е.Ю., Лаптев И.А., Выборная Т.В. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* — продуцент янтарной кислоты // RU 2487931, 2013.
15. Финогенова Т.В., Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Чернявская О.Г. Перспективы производства органических кислот дрожжами *Yarrowia lipolytica* // Прикл. биохим. микробиол. — 2005. — Т. 41. — № 5. — С. 478–486.
16. Arzumantov T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeated-batch culture on ethanol // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — Vol. 53. — No. 5. — P. 525–529.
17. Bostock R.M., Kuc J.A., Laine R.A. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato // Sci. — 1981. — Vol. 212. — P. 67–69.
18. Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Kamzolova S.V., Vinter M.V., Vainshtein M.B. Arachidonic acid synthesis by glycerol-grown *Mortierella alpina* // European Journal of Lipid Science and Technology. — 2012. — Vol. 114. — No. 7. — P. 833–841.

19. *Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Mironov A.A., Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Vainshtein M.B.* Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina* // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2014. – Vol. 116. – P. 429–437.
20. *Dedyukhina E.G., Kamzolova S.V., Vainshtein M.B.* Arachidonic acid as an elicitor of the plant defense response to phytopathogens (Review) // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. – 2014. – Vol. 1. – No. 1. – P. 1–6.
21. *Eroshin V.K., Dedyukhina E.G.* Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 18. – P. 165–167.
22. *Eroshin V.K., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Zhelifonova V.P., Kurtzman C.P., Bothast R.J.* Arachidonic-acid production by species of *Mortierella* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 12. – P. 91–96.
23. *Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I.* Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis // *Process Biochem.* – 2000. – Vol. 35. – P. 1171–1175.
24. *Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., ... & Stewart A.* Have biopesticides come of age? // *Trends in biotechnology*. – 2012. – Vol. 30. – No. 5. – P. 250–258.
25. *Huang C.B., George B., Ebersole J.L.* Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms // *Arch. Oral Biol.* – 2010. – Vol. 55. – No. 8. – P. 555–360.
26. *Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Zhang K., Liu X., Li S., Peng C.* A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina* // *Biotechnol Lett.* – 2008. – Vol. 30. – P. 1087–1091.
27. *Kamzolova S.V., Shishkanova N.V., Morgunov I.G., Finogenova T.V.* Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica* // *FEMS Yeast Research*. – 2003. – Vol. 3. – P. 217–222.
28. *Kamzolova S.V., Yusupova A.I., Vinokurova N.G., Fedotcheva N.I., Kondrashova M.N., Finogenova T.V., Morgunov I.G.* Chemically assisted microbial production of succinic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 83. – No. 6. – P. 1027–1034.
29. *Kamzolova S.V., Lunina J.N., Morgunov I.G.* Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2011a. – Vol. 88. – No. 12. – P. 1965–1976.
30. *Kamzolova S.V., Fatykhova A.R., Dedyukhina E.G., Anastassiadis S.G., Golovchenko N.P., Morgunov I.G.* Citric acid production by yeast grown on glycerol containing waste from biodiesel industry // *Food Technology and Biotechnology*. – 2011b. – Vol. 49. – No. 1. – P. 65–74.
31. *Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Yusupova A.I., Morgunov I.G.* Succinic acid production from n-alkanes // *Engineering in Life Sciences*. – 2012a. – Vol. 12. – No. 5. – P. 560–566.
32. *Kamzolova S.V., Chiglintseva M.N., Lunina J.N., Morgunov I.G.* α -Ketoglutaric acid production by *Yarrowia lipolytica* and its regulation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012b. – Vol. 96. – No. 3. – P. 783–791.
33. *Kamzolova S.V., Morgunov I.G.* α -Ketoglutaric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 97. – No. 12. – P. 5517–5525.
34. *Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Shemshura O.N., Bekmakhanova N.E., Lunina J.N., Samoilenko V.A., Morgunov I.G.* The production of succinic acid by yeast *Yarrowia lipolytica* through a two-step process // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014a. – Vol. 98. – No. 18. – P. 7959–7969.
35. *Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Dedyukhina E.G., Samoilenko V.A., Lunina J.N., Mironov A.A., Allayarov R.K., Morgunov I.G.* The peculiarities of succinic acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014b. – Vol. 98. – No. 9. – P. 4149–4157.
36. *Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Lunina J.N., Zelenkova N.F., Morgunov I.G.* Production of technical-grade sodium citrate from glycerol-containing biodiesel waste by *Yarrowia lipolytica* // *Bioresource Technology*. – 2015. – Vol. 193. – P. 250–255.
37. *Kang H.C., Park Y.H., Go S.J.* Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid // *Microbiological research*. – 2003. – Vol. 158. – No. 4. – P. 321–326.
38. *Kolouchova I., Sigler K., Schreiberova O., Masak J., Rezanka T.* New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid // *Bioresour Technol.* – 2015. – Vol. 192. – P. 726–734.
39. *Li X., Lin Ye, Chang M., Jin Q., Wang X.* Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with a two-stage pH control strategy // *Bioresour Technol.* – 2015. – Vol. 181. – P. 275–282.
40. *Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N.* The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013a. – Vol. 97. – No. 12. – P. 7387–7397.
41. *Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A.* Enhanced α -ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013b. – Vol. 97. – No. 19. – P. 8711–8718.
42. *Morgunov I.G., Kamzolova S.V.* Physiologo-biochemical characteristics of citrate-producing yeast *Yarrowia lipolytica*

- grown on glycerol-containing waste of biodiesel industry // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2015. — Vol. 99. — No. 15. — P. 6443–6450.
43. Okino S., Noburyu R., Suda M., Jojima T., Inui M., Yukawa H. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2008. — Vol. 81. — P. 459–464.
44. Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications // *Biomass Bioenergy*. — 2013. — Vol. 48. — P. 148–166.
45. Streekstra H. On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid // *J. Biotechnol.* — 1997. — Vol. 56. — P. 153–165.
46. Tan M.J., Chen X., Wang Y.K., Liu G.L., Chi Z.M. Enhanced citric acid production by a yeast *Yarrowia lipolytica* over-expressing a pyruvate carboxylase gene // *Bioprocess Biosyst. Eng.* — 2016. — Vol. 39. — No. 8. — P. 1289–1296.
47. Ward O., Singh A. Omega 3/6 fatty acids: Alternative sources of production // *Process Biochem.* — 2005. — Vol. 40. — P. 3627–3652.
48. Xing J. The biological activities of palmitoleic acid: opportunities for exploitation. Degree: Ph.D. Degree Year: 2001 Institute: Rutgers The State University of New Jersey — New Brunswick.
49. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Sobolevskaya T.I., Laptev I.A., Vybornaya T.V., Larina A.S., Matsui K., Fukui K., Sineoky S.P. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* // *Biotechnol Bioeng.* — 2010. — Vol. 7. — P. 673–682.
50. Zhang A.H., Ji X.J., Wu W.J., Ren L.J., Yu Y.D., Huang He. Lipid fraction and intracellular metabolite analysis reveal the mechanism of arachidonic acid-rich oil accumulation in the aging process of *Mortierella alpina* // *J. Agric. Food Chemistry*. — 2015. — Vol. 63. — No. 44. — P. 9812–9819.

MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF PREPARATIONS BASED ON ORGANIC ACIDS AS PLANT PROTECTION PRODUCTS

I.G. MORGUNOV², E.G. DEDYUKHINA¹, S.V. KAMZOLOVA¹, T.I. CHISTYAKOVA¹, Ju.N. LUNINA¹, A.A. MIRONOV¹, N.N. STEPANOVA^{1,2}, O.N. SHEMSHURA³, M.B. WEINSTEIN^{1,2}

¹G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region,

²Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia;

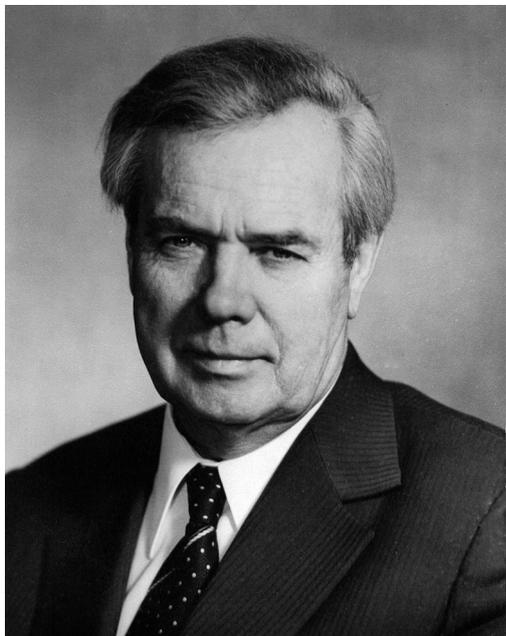
³Institute of Microbiology and Virology, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan

At present, the plant protection from the most hazardous diseases and harmful pests in the world is realized mainly (by 99%) with the use of fungicides. Negative consequences of the pesticide application are well known — the pollution of environment and agricultural crops with the residues of chemical preparations including heavy metals, nitrates and other compounds harmful to human health. The basic tendency in the development of world science in the field of plant protection concerns with reducing the use of fungicides and their replacement by environmentally acceptable preparations. In the present review, literature data on the use of organic acids (arachidonic, citric, succinic, α -ketoglutaric, palmitoleic, and others) for plant protection are summarized and modern technologies for microbiological production of these products are discussed.

Keywords: plant protection, metabolites of microorganisms, organic acids, elicitor, biotechnologies.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2016 ГОДА

К 100-летию со дня рождения В.Д. Беляева — организатора микробиологической промышленности СССР*



В 2016 году исполнилось 100 лет со дня рождения Василия Дмитриевича Беляева, крупного организатора микробиологической и химической промышленности в нашей стране, первого руководителя Главного управления микробиологической промышленности при Совете Министров СССР.

О таких людях обычно говорят, что они появляются в нужное время и в нужном месте. В случае В.Д. Беляева мы имеем как раз тот счастливый случай, когда столь ответственный пост занял человек, в высшей степени подготовленный к выполнению ответственной государственной задачи — создать в масштабах всей страны новую производственную отрасль, причем в кратчайшие сроки.

Биографические данные. В.Д. Беляев родился 23 января 1916 года в деревне Беляевка Орловской области в семье железнодорожника. Получил трудовое воспитание, которое закалило его характер и приучило к постоянной созидательной работе. В 1920-е годы семья переехала в Донбасс, где он повторил путь, которым шли многие его современники-юноши: школа, ФЗУ, рабфак, сочетание учебы с трудовой деятельностью.

* Материал подготовлен редколлегией на базе информации, предоставленной семьей В.Д. Беляева, а также печатных и Интернет-материалов.

В 1935 году произошло судьбоносное событие в его жизни — попытка получить высшее образование в Ленинградском индустриальном институте, которая в конечном итоге привела в химико-технологический институт имени Ленсовета, знаменитую «Техноложку», кузницу химических кадров страны (рис. 1).

Преподаватели были сильные, авторитетные, старой, еще дореволюционной школы, носители интеллигентности и уважения к людям. Среди них были выдающиеся имена: академики А.Я. Фаворский, С.В. Лебедев, профессора В.Я. Курбатов, Н.С. Михельсон и др. Физику читал сын И.П. Павлова Владимир Иванович, доктор физико-математических наук.

Учился В.Д. Беляев отлично, с огромным интересом. Его учебные успехи по тогдашним традициям немедленно обуславливали общественное признание и соответственно большой груз внеучебных обязанностей. На его долю выпала даже довольно ответственная и почетная должность председателя Студенческого совета института (с 4-го курса).

Преддипломную практику он проходил в г. Дзержинске (рядом с г. Горьким) на Чернореченском химзаводе. Диплом об окончании специального факультета защитил с отличием в 1941 году и сам попросил направить его в Дзержинск (к тому же там уже трудились на «Новом заводе», или «Заводстрое», институтские товарищи). Он не искал легких путей: всегда на жизненной развилке выбирал самое тяжелое. Он как бы жаждал приложения своей энергии к решению задач повышенной сложности. Впрочем, он был не одинок, таких было много, вокруг только и говорили о Чкалове и челюскинцах: подвига желали если не все, то подавляющее большинство.

Вот отсюда и пошла химическая стезя В.Д. Беляева, по которой он прошел путь от рядового работника до министра. Начал он трудиться с должности сменного инженера в цехе № 14 завода № 96. Работа химиков была нелегкой и сопряженной с профессиональной вредностью, однако молодые специалисты любили свое дело. Здесь Василий Дмитриевич нашел спутницу жизни Надежду Политову, с которой вместе они прожили счастливую жизнь и воспитали сына и дочь.

Трудовые занятия шли своим чередом. В 1942 году он был назначен начальником смены в цехе № 14, в 1943 — заместителем начальника цеха, в 1944 — начальником цеха. В 1946 году пришел приказ из министерства — его утвердили главным инженером Управления капитального строительства завода. Именно тогда он приобрел

бесценный опыт руководства крупными коллективами, который так пригодился в последующем. Немаловажно было и овладение строительной спецификой, что также послужило ему впредь.



Рис. 1. Ленинградский химико-технологический институт, где учился В.Д. Беляев

1948 год стал решающим в творческой судьбе В.Д. Беляева. Его как специалиста уже очень ценили в Москве, и ему был предложен выбор: или высокий пост в министерстве, или должность директора завода в Сталинграде. Он выбрал последнее и в том же году перебрался с семьей в героический город, став директором завода № 91 им. С.М. Кирова. Здесь он трудился 10 лет, а в 1959 году он был назначен первым заместителем председателя Нижне-Волжского Совета народного хозяйства, объединявшего экономику трех областей — Волгоградской, Саратовской и Астраханской. Это была высокая государственная должность, сфера и уровень решаемых задач которой отвечали его опыту и эффективности деятельности.

Дальше в 1964 году последовал переход в Москву сначала на должность заведующего Отделом химической промышленности Бюро ЦК КПСС по РСФСР, а затем — заместителя Министра химической промышленности СССР. И вот после Постановления Совета Министров СССР от 18 февраля 1966 года «О развитии микробиологической промышленности и об организации управления этой промышленностью» 21 марта этого года было организовано Главное управление микробиологической промышленности (Главмикробиопром) при Совете Министров СССР, начальником которого стал В.Д. Беляев. Это была министерская должность с высочайшей степенью ответственности и концентрацией задач по времени и масштабу.

Значимость такого государственного решения обосновывалась, в частности, так: «...В биологической науке определилось направление — микробиологический

синтез и ферментативный катализ, дающие возможность получать ценные биологически активные вещества для сельского хозяйства и интенсифицировать ряд технологических процессов в промышленности. Применение продуктов микробиологического синтеза позволит улучшить обеспечение животноводства белково-витаминными кормами, растениеводства — бактериальными удобрениями и препаратами для борьбы с вредителями растений».

Предсуществующая основа для развития биотехнологии была. 23 сентября 1963 года Постановлением Правительства СССР было создано Управление микробиологического синтеза в составе Госхимнефтекомитета. В структуру последнего был передан филиал НИИ гидролизной и сульфитно-спиртовой промышленности Гослескомитета, который был преобразован во Всесоюзный НИИ биосинтеза белковых веществ (ВНИИ-синтезбелок). Впоследствии этот институт стал одним из ведущих в структуре Главмикробиопрома.

В 1964–1965 гг. стало интенсивно наращиваться опытное производство биомассы БВК. Помимо Краснодарского биохимзавода, в этой работе приняли участие вновь организованные Новочеркасский завод синтетических продуктов, Кропоткинский химкомбинат и др. К началу 1965 года уже было наработано 120 тонн БВК и 14 тонн белково-жировых концентратов. Всесоюзное научно-техническое межведомственное совещание, состоявшееся в марте 1965 г., подтвердило кормовую ценность, зоотехническое и санитарно-гигиеническое соответствие наработанных продуктов. На очереди стояло проектирование заводов мощностью 35 тысяч тонн в год по сухой бимассе.

Но это была прединдустриальная фаза развития биотехнологии. Поэтому понадобился человек, который мог бы дать толчок к началу крупнотоннажного производства продуктов биосинтеза. Им и оказался В.Д. Беляев, который имел опыт такой деятельности в химической промышленности.

В состав новой отрасли вошли 62 предприятия по производству кормовых дрожжей из растительного сырья, ферментов, органических кислот, бактериальных удобрений, средств защиты растений, кормовых антибиотиков и витаминов, 10 строящихся предприятий, 2 научно-исследовательских и 1 проектный институты. С этой стартовой позиции отрасль начала интенсивно развиваться. Вскоре стали видны первые существенные результаты: разработаны перспективные планы развития отрасли, формировались отраслевые НИИ и опытные производства и т.д. Были построены крупные предприятия по производству белково-витаминных концентратов (БВК).

Начали выпускать продукцию: Кировский, Мантуровский и другие заводы по производству кормовых дрожжей из растительного сырья; Чаренцаванский, Ливанский, Шебекинский заводы аминокислот. Более чем 10-летний период руководства Беляевым Главмикробиопромом дал большой социально-экономический эффект.

Огромная интенсивность работы требовала максимальной отдачи сил, прежде всего, руководителя. Это в известной мере сказывалось на здоровье. В 1979 году Василий Дмитриевич, никогда не жаловавшийся на свое самочувствие, неожиданно заболел. Болезнь развивалась стремительно (онкологический диагноз), и в июле этого года он умер. Похоронен он на Новодевичьем кладбище Москвы. За несколько месяцев до смерти он написал свои воспоминания: точные, искренние, достоверные (хранятся в семье).

Творческий вклад. Приведенная канва жизни не исчерпывает сущности его личности и масштаба свершенных им дел. Это требует пояснения и более глубокого проникновения в конкретные вещи, уже ставшие историей. При этом главный акцент будет сделан на последнем периоде его жизни, когда в наибольшей степени проявился его разносторонний талант.

Вначале несколько слов об основах нового научно-практического направления — промышленной микробиологии или биотехнологии, как стали называть его позже. За границей к нему начали проявлять интерес после Второй мировой войны, особенно в связи с недостатком продуктов питания, дефицитом белков, витаминов и др. Постепенно данная проблема стала актуализироваться и в СССР. Руководство страны своевременно оценило необходимость широкого развертывания этой отрасли и предприняло соответствующие меры, как всегда в таких случаях, когда нужны были экстренные действия.

Еще со времен Сталина в аналогичных ситуациях тщательно отбиралась кандидатура первого лица, которое обладало бы лидерскими качествами и которое могло бы взять на себя персональную ответственность за успех дела (неуспех не рассматривался как альтернатива, тогда это, по партийно-административным принципам, было не принято). Поэтому обсуждали 11 кандидатов, довольно достойных, однако предпочтение было отдано В.Д. Беляеву (именно его одобрил Д.Ф. Устинов, бывший в то время секретарем ЦК КПСС). Скорее всего, сработал послужной список: многолетняя безупречная работа на химических производствах, постоянное внимание центра к его карьерному росту и т.д. Как бы то ни было, но выбор пал на него. И руководители государства не ошиблись и помогали ему во всем, чтобы дело продвигалось быстрее.

Особенно следует подчеркнуть роль Председателя Совета Министров СССР А.Н. Косыгина. Имеется достоверная информация в виде стенограмм о том, как Алексей Николаевич вникал во все детали развития нового направления и применял свой сверхавторитет для однозначного и быстрого решения вопроса. В частности, именно премьер-министр ускорил процесс формирования комплекса отраслевых научно-исследовательских институтов. То же случилось и в 1972 году, когда А.Н. Косыгин помог быстрее ввести в строй Н.Горьковский завод БВК. По-видимому, он чувствовал в лице В.Д. Беляева человека дела, на которого можно возложить повышенную обязанность и быть полностью уверенным, что будет предпринято все возможное и невозможное для выполнения задачи. То, что стартовый и последующие периоды развития биотехнологии в стране держало на личном контроле такое высокое государственное лицо, сыграло свою определяющую роль. Не оставались безучастными и другие крупные руководители (Устинов Д.Ф., опытный государственный деятель, Демичев П.Н., секретарь ЦК КПСС, Байбаков Н.К., Председатель Госплана СССР, и др.). Практически везде был обеспечен режим наибольшего благоприятствования — биотехнологии был дан зеленый свет.

В частности не хотелось бы упустить главного, что довелось сделать В.Д. Беляеву за отпущенные ему судьбой 13 лет. А это были поистине революционные меры по объединению на первоначальном этапе многочисленных разноместных предприятий микробиологического профиля в реально действующий комплекс. Тогда это называлось очень емким и точным термином «единая научно-техническая политика». На бумаге все выглядело закономерно и логично, а вот претворение в жизнь требовало огромной самоотдачи от лидеров и главное — они должны были всегда видеть чуть (а иногда значительно!) дальше конкретных исполнителей и безгранично верить в достижимость поставленной цели. Василий Дмитриевич обладал такими качествами. Имеется много свидетельств этому, особенно из воспоминаний работавших с ним специалистов.

Следующий этап, фактически начавшийся параллельно, — это создание новой инфраструктуры, в которой гармонично сочетались наука и производство. Все это основывалось на унитарной доктрине: «Строить и строить!». Размах строительных работ под эгидой Главмикробиопрома по всей обширной территории Советского Союза был беспрецедентен. И везде Василий Дмитриевич поспевал. График его поездок поражает: Рига, Краснодар, Горький, Запорожье, Одесса, Кириши,

Ефремов и т.д. При этом он нередко выезжал на место, когда шел еще нулевой цикл и рабочие жили в палатках. Были это не инспекционные проверки с «разносами», а деловое, профессиональное общение доброжелательного, расположенного к труженикам любого уровня знатока созидательного процесса в крупномасштабном общегосударственном варианте. Не случайно академик Г.К. Скрыбин на церемонии прощания с покойным В.Д. Беляевым сказал: «Василий Дмитриевич оставил о себе хорошую память — он построил заводы».

Заботился он и о подготовке кадрового корпуса. В числе перспективных кадров — директор завода БВК в Киришах В.А. Быков, впоследствии министр медицинской и микробиологической промышленности СССР, академик РАСХН, РАМН и РАН. Он высоко ценил ученых, занятых в отрасли (Чепиго С.В., Калуныц К.А., Алиханян С.И. и др.). Было привлечено к работе и много других квалифицированных работников в центре и на местах.

И, конечно, гигантский диапазон субъектов отраслевого управления диктовал необходимость создания новых организационных форм руководства, ведь по сути нужно было координировать деятельность огромных рабочих «армий». С этой целью к 1980 году уже были сформированы всесоюзные объединения «Союзбакпрепарат» (50 заводов), «Союзгидролизпром» (42 завода), «Союзпромбелок» (8 заводов) и научно-производственное объединение «Биопрепарат» (создано в 1974 г.). Излишне говорить о том, что все перечисленные действия, своевременно выполненные, в первую очередь, по производству кормового белка, помогли решить проблему продовольственной безопасности страны. На рисунке 2 приведена география основных созданных биотехнологических предприятий.



Рис. 2. Географическое распределение основных предприятий Главмикробиопрома по территории СССР (1980 г.)

За это время удалось обеспечить значительный прирост основных видов биотехнологической продукции (табл. 1).

Таблица 1

Рост производства основных видов биотехнологической продукции в СССР

Продукты	Годы		
	1966 г.	1972 г.	1979 г.
Кормовой белок микробиологический, тыс. тонн	53,5	208,3	626
Лизин, тонн	16,7	310,4	6742
Кормовые антибиотики в пересчете на бацитрацин, тонн	165	466	1613,8
Ферментные препараты, усл. тонн	82,3	396	3209,9
Кормовой витамин В ₁₂ , кг	9	658,7	1179,4
Премиксы, тыс. тонн	—	46,4	293,9
Микробиологические средства защиты растений, тонн	22	506,9	5590

Понимание роли науки. Здесь не следует впадать в излишнюю эмоциональность оценки, но факты неопровержимы — В.Д. Беляев хорошо понимал значение научных основ производства, в том числе в плане работы на опережение на базе прогрессивных технологий. В данном контексте характерен следующий эпизод, запечатленный в дневниковой записи министра. Идет 1968 год, два года после назначения руководителем отрасли. Фиксируется содержание его телефонного разговора с А.Н. Косыгиным:

«Косыгин: Вы звонили мне?»

Ответ: Да.

Косыгин: Я слушаю Вас. Что касается институтов, то мы сделаем, как решили. Надеюсь, Вы довольны этим решением?»

Ответ: Да, конечно, спасибо».

Так что наука вставлялась в планы в первую очередь и была поводом для повышенного внимания наверху.

Результат оказался впечатляющим. Максимально быстро был создан ВНИИгенетика (для получения высокопродуктивных штаммов микроорганизмов с уникальной коллекцией соответствующих штаммов), получил приоритетную поддержку ВНИИсинтезбелок (для разработки новых технологий получения белка). Были организованы также ВНИИбакпрепаратов, ВНИИбиотехника. Этим действиям способствовало ясное видение

проблемы руководителем. В.Д. Беляев отдавал себе отчет, что дальнейший прогресс биотехнологии немалым без совершенствования существующих технологий с учетом мировых достижений и тенденций развития в области молекулярной биологии и генетики. Поэтому перспективы развития отрасли он видел в развертывании фундаментальных исследований как базы для прикладных разработок. Помимо отраслевых научных подразделений в виде профильных институтов и конструкторских бюро, Главмикробиопромом было материально поддержано развитие фундаментальных исследований в стране в целом. Так, был построен на биологическом факультете МГУ корпус для проведения научных исследований по молекулярной биологии (ныне в нем располагается Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ), оказана помощь в строительстве специального лабораторного корпуса в Институте элементоорганических соединений АН СССР для осуществления работ по созданию синтетической пищи (это делалось во взаимодействии с академиком А.Н. Несмеяновым). Был введен в строй специальный Институт биологического приборостроения, его первым директором стал Ю.Т. Калинин, впоследствии много сделавший для отечественной медицинской промышленности и биотехнологии (сейчас — это ГНЦ «Государственный НИИ биологического приборостроения»).

В.Д. Беляеву с его тактом, благородством и умением ориентировать человеческий фактор к нужной цели удалось объединить усилия ученых АН СССР и отраслевых институтов, что дало возможность в сжатые сроки внедрить научные разработки на заводах отрасли: например, основать не имеющее аналогов в мире направление по промышленному получению кормового белка. Впервые были созданы, как уже говорилось, производства биологических средств защиты растений, биоудобрений, аминокислот, ферментов, витаминов, кормовых и ветеринарных антибиотиков.

Важный блок взаимодействия с академической наукой был реализован в Пущино на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР в контакте с Всесоюзным НИИ биосинтеза белковых веществ Главмикробиопрома и рядом других организаций и ведомств. Благодаря совместным работам были представлены основы для создания первого в мире крупнотоннажного производства белково-витаминных концентратов для откорма сельскохозяйственных животных. Разработчики (Иерусалимский Н.Д., Скрыбин К.Г., Гололобов А.Д., Градова Н.Б.) за это исследование были удостоены Государственной премии СССР.

Они предложили получать БВК из углеводов нефти — жидких очищенных парафинов. Данная технология была внедрена на вновь построенном Уфимском опытно-промышленном заводе БВК, а в 1971—1975 гг. было построено четыре крупных предприятия по производству БВК, в их числе в Кстове, Светлоярске, Киришах.

Для него были обычным делом постоянные персональные контакты с учеными. Это характеризовало стиль его работы: высокое административное положение могло ограничиваться письменными приказами и распоряжениями. Однако он широко использовал и метод личного общения. И воспоминания, и фотолетопись демонстрируют эту замечательную русскую черту Василия Дмитриевича. В этих диалогах с выдающимися интеллектуалами государства он находил ответы на трудные вопросы по всему спектру технологических циклов и соответственно мог в нужный момент скорректировать управленческие решения. А ведь среди них были такие имена, как А.Н. Несмеянов (крупнейший химик, бывший президент АН СССР), А.А. Имшенецкий, Н.Д. Иерусалимский, Г.К. Скрыбин и др. Было общение и с А.Н. Белозерским и Ю.А. Овчинниковым, вице-президентами АН СССР, людьми, курировавшими химическую науку в Академии. Безусловно, у Главмикробиопрома были тесные взаимоотношения с Государственным комитетом по науке и технике СССР (ГКНТ). Очень показательна в этом отношении совместная фотография В.Д. Беляева и В.А. Кириллина, председателя ГКНТ СССР (рис. 3).



Рис. 3. Начальник Главмикробиопрома В.Д. Беляев и председатель ГКНТ СССР В.А. Кириллин на открытии Международной выставки «Микробиопром-73» (Москва, ВДНХ, январь 1973 г.)

Следует специально остановиться на XIV Международном генетическом конгрессе, состоявшемся в Москве 21—30 августа 1978 года под девизом «Генетика и благосостояние человечества». В его работе приняли участие более двух тысяч человек из 57 стран, были орга-

низованы 32 секции, сделано 1800 докладов. 41 год назад также планировалось проведение подобного конгресса (седьмого по счету) в Москве, на котором президентом должен быть Н.И. Вавилов, но он не состоялся в связи с преследованием генетики. Так что мероприятие 1978 года было данью начавшемуся в СССР возрождению генетических работ (биотехнология также вписывалась в этот реабилитационный процесс). Правда, ряд зарубежных ученых бойкотировал конгресс в связи с вопросом о советских диссидентах, однако в целом профессиональное общение специалистов было обеспечено.

Конгресс открылся 21 августа в Кремлевском дворце съездов (там же состоялось закрытие 30 августа), а работа его проходила в МГУ. Имеется фотография, где запечатлен президиум конгресса (рис. 4). В центре находится вице-президент АН СССР, академик Ю.А. Овчинников, по левую руку от него сзади, во втором ряду сидит академик А.А. Баев, а по правую руку в первом ряду — В.Д. Беляев. Это, конечно, важное обстоятельство, которое свидетельствовало о том, что новейшие достижения генетической науки пришли в производство и пользуются государственной поддержкой.



Рис. 4. Президиум XIV Международного генетического конгресса. В центре за столом президиума — председатель президиума конгресса, академик Ю.А. Овчинников, вице-президент АН СССР. По левую руку от него, во втором ряду второй — академик А.А. Баев. По правую руку, в первом ряду пятый от председателя — В.Д. Беляев, начальник Главмикробиопрома (Москва, август 1978 г.)

Награды. Человек такого ранга не мог не удостоиться соответствующих поощрений. Он награжден орденом Ленина (1971), орденом Трудового Красного Знамени дважды (1965, 1976), медалью «За трудовую доблесть» (1944), медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.» (1945), медалью «За трудовое отличие» (1956). Является лауреатом Ленинской премии (1960) за работу в области химической технологии. 13 января 1976 года ему присвоено звание Почетный химик СССР. Посмертно Академия медико-технических наук ежегодно присуждает премию имени Василия Дмитриевича Беляева за работы в области промышленной биотехнологии.

Личностные качества. В.Д. Беляев относился к поколению, выросшему и сформировавшемуся после революции. Несмотря на бытовые и прочие лишения, у

многих было привито не подлежащее сомнению чувство социальной справедливости. Что касается молодых мужчин, особенно из малообеспеченных слоев населения, то была всеобщая тяга к знаниям, культ здорового образа жизни, спортивности, дух товарищества и взаимовыручки, истинный патриотизм. В общежитиях столиц и больших городов росли и выковывались характеры тысяч и тысяч юношей, которым было суждено выдержать испытания войной и ускоренной послевоенной реконструкцией народного хозяйства.

Василий Дмитриевич был одним из них, но отличался, скорее всего, большей собранностью, природной сметкой и в известной мере талантливостью, дисциплинированностью и глубиной понимания сотоварищей, что очень помогло ему в будущем на высоких постах и оставило добрую память о нем в сердцах большого числа современников.

Характеристики, которые дают его сын Сергей Васильевич и дочь Ирина Васильевна, помимо сыновне-дочернего естественного уважения и почитания, вместе с собранными ими материалами предоставляют дополнительные сведения, которые еще более упрочивают его образ как сильной и красивой личности. Мемуарная информация, в том числе и его собственные воспоминания, также высвечивает грани его дарования.

Многие авторы подчеркивают выдержку, вежливость и доброжелательность Василия Дмитриевича. Однако он мог быть и строгим и непримиримым и не любил менять принятое решение, если чувствовал свою правоту. Единственное исключение он делал, говоря полшутя, «для своей жены и своего помощника Б.Я. Неймана».

Выдержки из воспоминаний (дневников) В.Д. Беляева. Вероятно, еще более полное представление о Василии Дмитриевиче можно получить из его воспоминаний и дневниковых записей, сохраненных потомками. Приведем некоторые из них. В них часто нет беллетристических, эмоциональных аспектов, свойственных реминисценциям; они хроникальны и вращаются вокруг делового стержня жизни.

Воспоминания детства больше окрашены впечатлениями, связанными с семейной ячейкой, что вполне естественно. Студенческая юность тоже выглядит типично для того времени. Мы сделаем больше акцент на профессиональной составляющей.

«Во все эти дела мне пришлось включаться с ходу. Первые месяцы я чувствовал недостаток конкретных знаний в строительстве, отсутствие организационного опыта в этой сфере. Но атмосфера была деловая, дел хватало всем. В заводской библиотеке я выбрал более 30 книг по вопросам строительства и усердно штудировал их. Многие вопросы оказались достаточно простыми. Моим преимуществом было знание технологии химических производств, что важно было при реконструкции цехов...

В конце концов я познал премудрости планирования строительно-монтажных работ, технологию этих работ, да и характеры исполнителей и, где нужно, изменял свой характер и твердость...».

«20 октября 1971 года. Вчера на Секретариате рассматривался вопрос об отставании в строительстве микробиологической промышленности. Очень строгая оценка. На заседании Президиума Совета Министров также имел серьезный упрек. В течение всего дня смотрим, анализируем все стройки, чтобы принять все необходимые меры по строительству. Лишний раз убеждаешься в том, что новое создавать трудно...».

«12 февраля 1972 года. Январь завалили... Был звонок Д.Ф. Устинова — пришлось объясняться. Был в Мантурово в связи с рассмотрением вопроса у Бушуева В.М. (ЦК КПСС). Завод вылезает из земли, но работы еще очень много. С Бушуевым обсуждали вопрос о сокращении сроков строительства Н.Горьковского завода, но он на 6—8 млн. рублей дороже. Это осложняет дело. Нужно найти способ решения этого вопроса».

«1 ноября 1972 года. Борьба за новый аппарат Б-50 с В.М. Бушуевым продолжается. Он сильно переживает, вчера звонил Смиртюкову М.С. Несколько раньше я ему тоже звонил. Вчера я позвонил А.Н. Косыгину, просил поддержать. Он запрашивал данные — сколько производим БВК и т.д.».

Последняя фраза в его воспоминаниях:

«А к нам пришла уже неуловимая старость и исподволь подтачивает наше здоровье, делает свое дело, которого никто не избежит» (написано 25 марта 1979 года).

Дальше следуют лаконичные дневниковые записи.

Литература

1. Беляев В.Д. Микробиология — сельскому хозяйству // *Партийная жизнь*. — 1971. — № 12.
2. Беляев В.Д. / В кн.: Теоретические основы химической технологии. — М.: АН СССР, 1972. — Т. VI (5). — С. 716—723.
3. Гамзюль В. Пламенное сердце // *Газета «Сибур-нефтехим»*, г. Дзержинск. — 2007 ноябрь. — № 33—35(4137—4139).
4. Гамзюль В. Цеху № 280 — 60 лет // *Газета «Сибур-нефтехим»*, г. Дзержинск. — 2005 сентябрь. — № 34(4040).
5. Котляр И. Исповедь бывалого дзержинца // *Общественно-политическая газета «Дзержинец»*, г. Дзержинск. — 1998 май. — № 81—83(16489—16491).
6. Кутятин Л.И., Константинов Ю.Н. Волгоградское ОАО «Химпром». Ретроспектива семидесятилетия (1931—2001 гг.). — Волгоград: Изд-во Волгоградского госуниверситета, 2002.
7. Мавродиев В.Е. Полвека в рабочем строю. — Волгоград: Нижне-Волжское изд-во, 1981. — С. 31—32.
8. Поправко Н.В. Первый руководитель микробиологической промышленности СССР / В кн.: Незабываемые встречи. — Калуга: Золотая аллея, 2013. — 112 с. — С. 46—55.
9. Развитие химической промышленности в СССР 1917—1980 гг. / Под ред. Костандова Л.А. и Жаворонкова Н.М. — М.: Наука, 1984. — Т. 2. — С. 346—351.
10. Решения Партии и Правительства по хозяйственным вопросам. — М.: Политиздат, 1968. — Т. 6. — С. 9.

К 10-летию со дня смерти академика РАМН А.А. Воробьева (1923–2006)*



В 2016 году исполнилось 10 лет со дня смерти первого президента Общества биотехнологов России им Ю.А. Овчинникова, академика РАМН Анатолия Андреевича Воробьева.

Принято в научном мире в таких случаях вспоминать о биографических данных, приводить ранее неизвестные факты, акцентировать внимание на наиболее существенные достижения. Наш журнал помещал некролог, в котором формальная сторона жизни и творчества ученого отражена более-менее полно (Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2006, Т. 2, № 2, С. 70–72.). Поэтому хотелось бы осветить другие ракурсы, связанные с деятельностью этого необычного человека.

«Куда девалась биотехнология?». Именно эта крылатая фраза была произнесена А.А. Воробьевым в Пушину на учредительном съезде специалистов в 2003 году, объявившем о создании или, точнее, воссоздании всероссийского общества биотехнологов. В самом деле, можно было понять заслуженного профессора, академика, генерал-майора медицинской службы, так много сделавшего для внедрения биотехнологических методов в микробиологию. Этот вопрос тогда задавали многие, особенно недавние лидеры отечественной биотехнологии (Быков В.А., Калинин Ю.Т. и др.). Что произошло с некогда процветающей научно-производственной отраслью?

На таком эмоциональном фоне было принято не совсем запоздалое решение об основании негосударственной структуры в национальном масштабе с целью возрождения целенаправленной работы в области теории, методологии и практики биотехнологии как междисциплинарного и межведомственного направления. И почетная и ответственная должность президента этого общества была возложена на А.А. Воробьева, причем в обстановке консенсуса и полной удовлетворенности участников съезда данной кандидатурой.

Как оказалось, выбор был правилен. Анатолий Андреевич сумел объединить разнопрофильных специалистов. Особенно удачен был подбор микробиологов и иммунологов — заведующих кафедрами медвузов. Они создали консолидированный костяк для начала работы общества. Далее стали привлекаться производственники и ученые других профилей — генетики, молекулярные биологи, биофизики, биоинформатики, экономисты и т.д. Благодаря такому начинанию удалось набрать темп и собрать заинтересованных специалистов из всех уголков страны. Больше того, работа Общества стимулировала другие государственные и общественные структуры к занятиям биотехнологией да и показала собственную высокую результативность, особенно в плане формирования концептуальных документов и объединения профильных специалистов.

Под его руководством были проведены ставшие традиционными конференции по медицинской биотехнологии в Краснодарском крае и по пищевой биотехнологии в Калининградской области. По его инициативе в Казани была проведена конференция по постгеномным технологиям и открыта мемориальная доска академику А.А. Баеву. Поддерживал он и намерение выпускать собственный журнал Общества.

В общем, нужно сказать, что работа А.А. Воробьева на посту Президента Общества биотехнологов России была весьма плодотворной. Приветствовал он и идею присвоения Обществу имени академика Ю.А. Овчинникова: известно, что он работал с ним в разных комиссиях. Больше того, они вместе написали «Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога» (1989).

Немного биографии. Военские будни. Перспекция позволяет лучше понять некоторые обстоятельства формирования той или иной личности, в особенности незаурядной. В случае А.А. Воробьева нужно особо отметить роль Военно-морской медицинской академии в Ленинграде, в которой он учился в предвоенные и военные годы (1940–1945). Это было уникальное учебное заведение. Особенно славился

* Материал подготовлен редколлегией

высоким уровнем ее преподавательский корпус. Как вспоминал о своей alma mater академик РАМН Д.С. Саркисов: «Мы думали, что это обычные преподаватели, а из них многих через три года избрали академиками только что основанной Академии медицинских наук СССР». Это, по сути, был аналог пушкинского лицея, только в медицине. Недаром многие из первых выпускников Военно-морской медицинской академии стали действительными членами АМН СССР (РАМН): Ф.И. Комаров, Д.С. Саркисов, О.С. Адрианов и др. Да и сам А.А. Воробьев также пополнил эти ряды, имея замечательные задатки южнорусского самородка (он родился в Краснодарском крае) и получив блестящее образование и научное воспитание.

Старт в медицинской науке с такой базой был удачен, и А.А. Воробьев быстро защитил кандидатскую диссертацию и стал специализироваться в области иммунологии, проработав в Военно-морской медицинской академии до 1956 года. С 1956 по 1978 гг. он трудился на разных должностях в НИИ Министерства обороны СССР. В это время им выполнен ряд важных работ по изготовлению анатоксинов против анаэробных инфекций, исследованию основ конструирования молекулярных вакцин, совершенствованию методов безыгольной инъекции при массовой вакцинации, изучению принципов получения пероральных вакцин.

Биотехнологический цикл. В 1978–1987 гг. А.А. Воробьев работал первым заместителем начальника по научной части Главного управления «Биопрепарат» при Главмикробиопроме (впоследствии — при Министерстве медицинской и микробиологической промышленности СССР). Здесь особенно проявились его качества ученого-новатора и умелого организатора. Он пришел в это учреждение за год до смерти первого руководителя Главмикробиопрома В.Д. Беяева и хорошо воспринял насажденный этим выдающимся государственным деятелем творческий дух и сохранил о нем благодарную память.

Педагогическая деятельность. В 1987 году А.А. Воробьев был приглашен на должность заведующего кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией ММА (ныне — Первый Московский медицинский университет) им. И.М. Сеченова. Как и везде, Анатолий Андреевич «пришелся ко двору». Он и на педагогическом поприще проявил свои лучшие черты человека, в высшей степени нацеленного на самоотдачу и принесение доброго и полезного, тем более для молодежи.

Академия медицинских наук СССР. После избрания А.А. Воробьева в 1990 г. академиком АМН СССР он на протяжении 15 лет был заместителем академика-секретаря Отделения профилактической медицины РАМН. И здесь он был на своем месте, выполняя огромную ответственную научно-организационную работу.

Писательский труд. Он был разносторонней личностью, у него были замечательные близкие друзья, которые тоже были самобытными, высокоинтеллигентными людьми. По-видимому, не случайно у него возникла потребность в самовыражении, нашедшая воплощение в виде сочинительства в мемуарном жанре и даже в написании стихотворений. Все это было серьезно и достаточно профессионально.

Редколлегия настоятельно рекомендует молодым людям, вступающим в науку, особенно иммунологам и микробиологам, ознакомиться с автобиографическими книгами Анатолия Андреевича: «Не подводя черты. Воспоминания академика — микробиолога и иммунолога» (2003); «Двадцатый век моими глазами» (2005).

Завещание ученого. Он завещал нам тему биологической безопасности. Это была его лебединая песня. Анатолий Андреевич готовил соответствующую конференцию, активизировал лидеров этого направления (а со всеми он был знаком), но она состоялась уже без него в Санкт-Петербурге, через три месяца после его кончины. Этого, конечно, мало для сохранения памяти об ученом. Нужны какие-то дальнейшие преемственные, конкретные дела.

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

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

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



Подписано к печати 30.09.16
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. Тираж 1000 экз.

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

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

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

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

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

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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