

**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), 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

Внутрипопуляционная гетерогенность параметров флуоресценции диатомовой водоросли *Attheya issurensis* при осмотическом стрессе.

В.А. Курочкина, Т.А. Белевич, Л.Ф. Ткебучава 5

Инвертазная активность при культивировании продуцентов лимонной кислоты — штаммов *Aspergillus niger* — на мелассе и гидролизатах крахмала.

Н.Ю. Шарова, Т.В. Выборнова, А.И. Килеева, А.Р. Юшкаускайте 16

Физико-химические свойства лектина микромицета *Rhizoctonia solani*.

Рин.С. Мухаммадиев, А.Н. Ибрагимов, Т.В. Багаева 23

Конверсия биомассы фототрофных микроорганизмов в сырье для получения биотоплив с помощью электросинтеза.

В.М. Пожидаев, К.В. Горин, Я.Э. Сергеева, П.М. Готовцев, Р.Г. Васильев 29

О действии N,N-дифенилгуанидиниевой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты на рост микроорганизмов сброженного ила при различных степенях разбавления.

Н.В. Волкова, С.В. Фридланд 36

Промоторы мутантного штамма бактериофага Т7 демонстрируют приспособление к РНК-полимеразе фага Т3 путем изменения своих электростатических свойств.

А.А. Осипов, С.Г. Камзолова 40

Сборка de novo транскриптома единичных нейронов стагоцистов виноградной улитки.

А.А. Осипов, Н.А. Асеев, Е.А. Чеснокова, М.В. Роцин, П.М. Колосов, Н.В. Баль, П.М. Балабан 47

Получение жидкого гуминового биопрепарата на основе вермикомпоста и виноградной выжимки.

А.Л. Телешев, И.А. Марынкин, И.Н. Титов, Я.Д. Чагава, Г.Э. Казиев 52

Модель хронического гипометаболизма глюкозы в мозгу экспериментальных животных.

Е.И. Самохина, И.Е. Мысин, А.А. Осипов, А.Е. Мальков, С.И. Паскевич, М.В. Молчанов,

И.Ю. Попова 56

Пространственная организация электростатических взаимодействий Т7 РНК-полимеразы с поздними промоторами Т7 ДНК.

А.А. Сорокин, Т.Р. Джелядин, М.А. Орлов, Е.А. Зыкова, С.Г. Камзолова 64

Роль микробиологии в сохранении памятников истории и культуры в музеях Москвы и Московской области.

Ю.А. Петушкова, Ю.П. Петушкова 72

Обзоры

Политические предпосылки формирования нормативной правовой базы в сфере генной инженерии в России и за рубежом.

Ю.А. Петушкова 82

Страницы истории

Юбилейные и знаменательные даты 2016 года 91

Правила для авторов 94

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Intrapopulation heterogeneity of fluorescence parameters of diatom *Attheya ussurensis* under osmotic stress.

V.A. Kurochkina, T.A. Belevich, L.F. Tkebuchava 5

Invertase activity under cultivation of producer of citric acid – *Aspergillus niger* strains – using molasses and hydrolysates of starch.

N.Yu. Sharova, T.V. Vybornova, A.I. Kileeva, A.R. Ushkauskayte 16

Physico-chemical properties of lectin of micromycete *Rhizoctonia solani*.

Rin.S. Mukhammadiyev, A.N. Ibragimov, T.V. Bagayeva 23

Conversion of biomass of phototrophic microorganisms into raw materials for producing biofuels using electrosynthesis.

V.M. Pozhidaev, K.V. Gorin, Y.E. Sergeeva, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov 29

Action of N,N-diphenylguanidine salt bis (hydroxymethyl) phosphinic acid on the growth of microorganisms of digested sludge at various degrees of dilution.

N.V. Volkova, S.V. Fridland 36

Promoters mutant strain of bacteriophage T7 RNA to demonstrate attachment of phage T3 polymerase by changing its electrostatic properties.

A.A. Osypov, S.G. Kamzolova 40

De novo assembly of the transcriptome of individual snail statocysts neurons.

A.A. Osypov, N.A. Aceyev, E.A. Chesnokova, M.V. Roshchin, P.M. Kolosov, N.V. Bal', P.M. Balaban 47

Production of liquid humic biopreparation on the basis of vermicompost, and grape pomace.

A.T. Teleshev, I.A. Marynkin, I.N. Titov, Y.D. Chagava, H.Z. Kaziev 52

Chronic glucose hypometabolism model in the brain of experimental animals.

E.I. Samokhina, I.E. Mysin, A.A. Osypov, A.E. Malkov, S.I. Paskevich, M.V. Molchanov,

I.Yu. Popova 56

The spatial organization of the electrostatic interactions of the T7 RNA polymerase with T7 DNA late promoters.

A.A. Sorokin, T.R. Dzhelyadin, M.A. Orlov, Ye.A. Zykhova, S.G. Kamzolova 64

The role of microbiology in the preservation of historical and cultural monuments in museums of Moscow and Moscow region.

Ju.A. Petushkova, Ju.P. Petushkova 72

Reviews

Political prerequisites for the formation of legislation in the field of genetic engineering in Russia and abroad.

Ju.A. Petushkova 82

Pages of history

Anniversary and significant dates 2016 91

Rules for authors 94

К читателям

В четвертом номере журнала за 2016 год в основном представлены оригинальные исследования по разным направлениям биотехнологии и физико-химической биологии.

Публикации начинаются с обстоятельной работы сотрудников биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова В.А. Курочкиной с коллегами, посвященной изучению флуоресценции у диатомовой водоросли при осмотическом стрессе.

В исследовании биотехнологов из Санкт-Петербурга (Шарова Н.Ю. и др.) изучалась активность широко используемого промышленного фермента — инвертазы — при глубинном культивировании на углеводсодержащих субстратах продуцентов лимонной кислоты: штаммов *Aspergillus niger*.

Мухаммадиев Рин.С., Ибрагимов А.Н., Багаева Т.В. (Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета) провели анализ физико-химических свойств лектина низшего гриба *Rhizostonia solani*. Показано, что наибольшая активность лектина наблюдалась при температуре 10–50 °С и рН 6,5–8,5.

Пожидаев В.М. с соавторами (НИЦ «Курчатовский институт») исследовали применимость электрохимического синтеза для переработки биомассы фототрофных микроорганизмов с целью получения биотоплив; при этом использовались различные методические подходы, включая применение катализаторов, протекание процессов электрохимического синтеза в водных растворах и т.д.

В работе Н.В. Волковой, С.В. Фридланда из Казанского национального технологического университета в рамках решения проблемы биологической очистки сточных вод было изучено воздействие N,N-дифенилгуанидиниевой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты на микроорганизмы сброженного ила.

Статья А.А. Осипова, С.Г. Камзоловой (Институт биофизики РАН, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН) «Промоторы мутантного штамма бактериофага T7 демонстрируют приспособление к РНК-полимеразе фага T3 путем изменения своих электростатических свойств» посвящена анализу возможных механизмов адаптации распознавания РНК-полимеразой T3 бактериофага неспецифических для нее поздних промоторов ДНК бактериофага T3.

В другой работе сотрудников тех же институтов, что и в предыдущей статье (Осипов А.А. и др.), произведена сборка de novo тотального транскриптома рецепторных волосковых клеток — нейронов statoцистов, органов равновесия виноградной улитки *Helix lucorum*, секвенированного с помощью системы Ion Proton.

Коллективом авторов из Московского педагогического государственного университета и Владимирского государственного университета имени А.Г. и Н.Г. Столетовых (Телешев А.А. и др.) описана технология получения жидкого гуминового биопрепарата на основе вермикомпоста и виноградной выжимки.

Группа авторов из Пушкино и Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (Самохина Е.И. и др.) изложила результаты разработки метода создания хронического гипометаболизма глюкозы в мозгу экспериментальных животных.

Сорокин А.А. и др. (Институт биофизики клетки РАН) изучили пространственную организацию электростатических взаимодействий T7 РНК-полимеразы с поздними промоторами T7 ДНК.

В заключительной части номера помещены оригинальная и обзорная статьи Петушковой Ю.А., Петушковой Ю.П. (Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). В первой статье представлено микробиологическое исследование микробиоты поврежденных музейных препаратов и ограждающих конструкций, а также воздушной среды в экспозиционных залах и фондохранилищах в музеях Москвы и Московской области. Во второй статье Ю.А. Петушкова провела сравнительный анализ нормативно-правовой базы в области геномной инженерии в РФ и за рубежом.

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

ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПАРАМЕТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *ATTHEYA USSURENSIS* ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

В.А. КУРОЧКИНА*, Т.А. БЕЛЕВИЧ, Л.Ф. ТКЕБУЧАВА

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

У диатомовой водоросли *Attheya ussurensis* оценивали относительную переменную флуоресценции отдельных клеток (F_v^n/F_m^n) на различных стадиях роста после пересева на среды с соленостью 8,8‰ (гипоосмотические условия), 35‰ (гиперосмотические условия) и 17,5‰ (контроль) в условиях изменения концентрации биогенных элементов и взаимодействия с популяцией диатомеи *Conticribra weissflogii*. В течение 48 часов после пересева измеряли удельную фотосинтетическую фиксацию углерода (P/N). Гетерогенность популяций *A. ussurensis* по F_v^n/F_m^n выявлена как в условиях осмотического стресса, так и в его отсутствие. Гипо- и гиперосмотический стресс в начале акклимации вызывал увеличение варибельности F_v^n/F_m^n по сравнению с контролем. В условиях лимитирования недостатком биогенных элементов высокая варибельность F_v^n/F_m^n отмечена при всех условиях солености. На внутрипопуляционную гетерогенность по этому параметру присутствие возможного конкурента оказывало меньшее влияние, чем осмотический стресс и наличие биогенных элементов. В процессе акклимации варибельность клеток по F_v^n/F_m^n снижалась. P/N в первые сутки была выше при акклимации к гипоосмотическому стрессу, а во вторые — гиперосмотическому.

Ключевые слова: диатомовая водоросль, *Attheya ussurensis*, флуоресценция, популяционная гетерогенность, осмотический стресс.

Введение

Соленость наряду со световыми условиями и обеспеченностью водорослей биогенными элементами является одним из основных факторов, определяющих фотосинтетическую активность фитопланктона. Как снижение солености среды (гипоосмотический стресс), так и увеличение (гиперосмотический стресс) вызывают изменения скорости фотосинтетической фиксации углерода [6], содержания фотосинтетических пигментов [9], скорости роста популяций водорослей [9, 19], скорости потребления биогенных элементов [19]. Все эти параметры представляют собой усредненные значения для популяции водорослей, тогда как сведения по изменчивости функциональных параметров отдельных клеток в популяции в ответ на осмотический стресс крайне мало численны [4]. Изучение фотосинтетических параметров

отдельных клеток как в оптимальных, так и в стрессовых условиях позволяет выявить функциональную неоднородность в пределах одной популяции и, как следствие, выживаемость популяции в изменяющихся экологических условиях [3, 8]. Поэтому исследования популяционной гетерогенности важны для понимания закономерностей функционирования фитопланктона и его продуктивности, а также для выявления определяющих их факторов [17].

Одним из показателей состояния фотосинтетического аппарата является величина относительной переменной флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m). В настоящей работе представлены данные о варибельности F_v/F_m отдельных клеток в популяции диатомовой водоросли *Attheya ussurensis* при акклимации к гипо- и гиперосмотическому стрессу в условиях изменения концентрации биогенных элементов и взаимодействия с популяцией водоросли *Conticribra weissflogii*.

Материалы и методы

Материалом послужила альгологически чистая культура диатомовой водоросли *Attheya ussurensis* Stonik, Orlova et Crawford, выделенная из планктонной пробы, отобранной из Уссурийского залива Японского моря [24], и акклимированная к солености 17,5‰ путем

© 2016 г. Курочкина В.А., Белевич Т.А., Ткебучава Л.Ф.

* **Автор для переписки:**

Курочкина Виктория Александровна
аспирант биологического факультета,
ФГОУ ВПО Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова,
119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12,
E-mail: v.kuro4kina@gmail.com

многократных пересевов на среду $f/2$ [14], приготовленную на основе искусственной морской воды. Маточная культура водоросли росла при естественном освещении и температуре около 20 °С.

Условия культивирования. Водоросли в экспериментах росли в накопительном режиме при температуре 20 °С, освещенности 75 мкЕ/м²·с и продолжительности светового периода 14 ч. Воду для приготовления культуральных сред получали путем разведения до определенной солености солевой смеси фирмы «SERA». Соленость воды проверяли электронным солемером Dist 2 (Hanna, Германия). Перед посевом воду трехкратно пастеризовали. Эксперименты проводили в двух повторностях.

Схемы экспериментов. С культурой было поставлено три серии экспериментов. Целью первой серии экспериментов (I) являлось изучение вариабельности параметров флуоресценции клеток *A. ussurensis* в накопительных культурах в условиях осмотического стресса. Водоросли из маточной культуры на экспоненциальной или в начале стационарной стадии роста сеяли на среды, обогащенные биогенными элементами согласно прописи

среды $f/2$, с соленостью 8,8‰ (I_{8,8}, гипосмотические условия), 17,5‰ (I_{17,5}, контроль) и 35‰ (I₃₅, гиперосмотические условия). Посевной титр составлял 20000 кл/мл, время культивирования – 35 сут. Во второй серии экспериментов (II) оценивали вариабельность параметров флуоресценции клеток *A. ussurensis* в условиях осмотического стресса при конкурентом взаимодействии. Из инокулятов *A. ussurensis* и *C. weissflogii* (Grunow) Stachura-Suchoples et Williams (Diatomeae) (синоним *Thalassiosira weissflogii* (Grunow)) сеяли моно- и смешанные культуры с таким расчетом, чтобы величины биомассы в посевных титрах были равны. Схема посева культур приведена в таблице 1.

Целью третьей серии экспериментов (III) являлась оценка кратковременной динамики параметров флуоресценции клеток *A. ussurensis* в условиях изменения солености. Для получения инокулята высокой плотности посевной материал центрифугировали на скорости 5 тыс. об./мин. Культуру, находящуюся на экспоненциальной стадии роста, высевали по схеме, представленной в таблице 2, и культивировали в течение 2 сут.

Таблица 1

Параметры посева культур *A. ussurensis* и *C. weissflogii* в ходе эксперимента II

	Эксперимент II _{8,8}		Эксперимент II ₃₅		Эксперимент II _{17,5}	
	однократное внесение перед посевом элементов по прописи среды $f/2$					
Соленость, ‰	8,8		35		17,5 (контроль)	
Посевной титр, кл/мл <i>A. ussurensis</i>	моно- культура 20·10 ³	смешанная культура 10·10 ³	моно- культура 20·10 ³	смешанная культура 10·10 ³	моно- культура 20·10 ³	смешанная культура 10·10 ³
<i>C. weissflogii</i>	6·10 ³	3·10 ³	6·10 ³	3·10 ³	6·10 ³	3·10 ³
Время культивирования, сут	25		21		23	

Таблица 2

Параметры посева культуры *A. ussurensis* в ходе эксперимента III

	Эксперимент III _{8,8}			Эксперимент III ₃₅		
	без внесения элементов		однократное внесение перед посевом элементов по прописи среды $f/2$	без внесения элементов		однократное внесение перед посевом элементов по прописи среды $f/2$
Соленость, ‰	8,8 (III _{8,8-6})	17,5 контроль (III _{17,5-6})	8,8 (III _{8,8+6})	35 (III ₃₅₋₆)	17,5 контроль (III _{17,5-6})	35 (III ₃₅₊₆)
Посевной титр, кл/мл	22,5·10 ³	22,5·10 ³	28,3·10 ³	36,01·10 ³	37,8·10 ³	48·10 ³

Оцениваемые параметры. Численность клеток (N) определяли методом прямого подсчета в камере Нажотта в трехкратной повторности.

Параметры флуоресценции оценивали сразу после посева, а затем каждые 2–3 дня (в эксперименте III — через 2, 4, 24 и 48 ч). В суспензиях клеток после 15-минутной темновой адаптации с использованием импульсного флуорометра [3] измеряли флуоресценцию при открытых (F_o) и закрытых (F_m) реакционных центрах и рассчитывали относительную переменную флуоресценции F_v/F_m , равную $(F_m - F_o)/F_m$. Аналогичные параметры измеряли у отдельных клеток водорослей ($F_o^n, F_m^n, F_v^n/F_m^n$) на переоборудованном флуоресцентном микроскопе «ЛЮМАМИЗ» по ранее описанной методике [3]. Величины F_v/F_m и F_v^n/F_m^n изменяются в диапазоне от 0 до 0,72 [3]. Высокие значения характерны для водорослей в хорошем физиологическом состоянии, тогда как низкие свидетельствуют о состоянии стресса [13]. В тексте принимали следующее ранжирование фотосинтетической активности (ФА) по величинам F_v^n/F_m^n : $<0,1$ — фотосинтетически неактивные (нежизнеспособные) клетки; $0,1–0,29$ — низкая; $0,30–0,49$ — средняя; $0,50–0,59$ — высокая; $\geq 0,60$ — максимальная ФА. При каждом измерении выборка составляла 100 клеток.

Сразу после посева водорослей на среды с разной соленостью, а также через 24 ч и 48 ч в эксперименте III оценивали фотосинтетическую фиксацию углерода (P) скляночным методом в радиоуглеродной модификации [23] при 4-часовой экспозиции.

Статистический анализ данных. Для сравнения степени варьирования F_v^n/F_m^n во времени и в популяциях, росших в различных условиях, использовали коэффициент вариации (CV). Достоверность различий ($p \leq 0,05$) средних значений F_v^n/F_m^n оценивали по критерию Манна — Уитни, достоверность различия CV — по критерию Флайгнера — Киллина с использованием программы PAST Version 2.04.

Результаты

Активный рост популяций *A. ussurensis* наблюдался при всех соленостях, за исключением 35‰ среды в условиях смешанной культуры (рис. 1). В гиперосмотических условиях водоросль находилась в угнетенном состоянии — клеточное деление ингибировалось на протяжении всего эксперимента (рис. 1в), что может быть проявлением конкурентных и/или аллелопатических взаимодействий между водорослями [2].

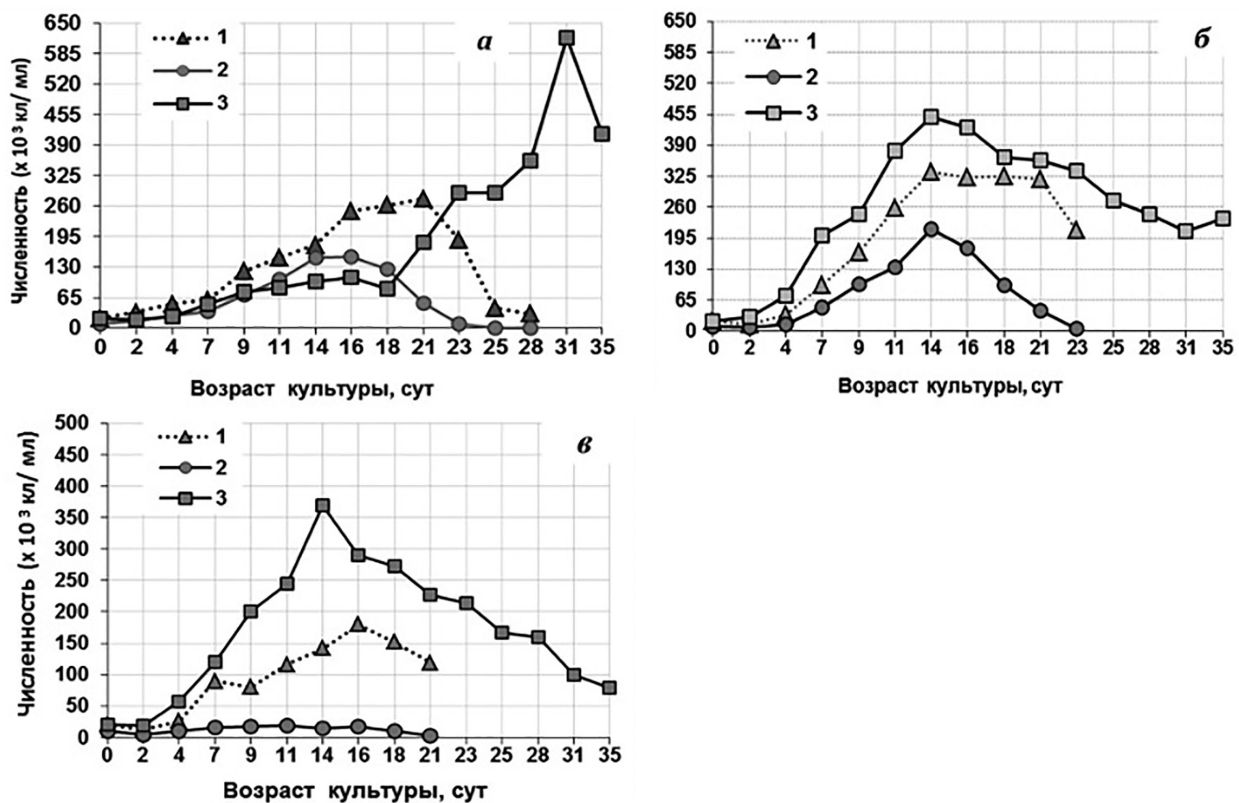


Рис. 1. Динамика численности *A. ussurensis* при солености 8,8‰ (а), 17,5‰ (б) и 35‰ (в) в эксперименте I (3), в моно- (1) и смешанной (2) культурах эксперимента II

Посевной материал *A. ussurensis* для контрольных опытов I_{17,5} и II_{17,5} достоверно не отличался по значениям F_v/F_m и средним значениям F_v^u/F_m^u . Однако распределение клеток по F_v^u/F_m^u в I_{17,5} отличалось от такового в II_{17,5}, в котором CV был ниже (табл. 3). В лаг-фазе и начале лог-фазы экспериментов I_{17,5} и II_{17,5} средние значения F_v^u/F_m^u достоверно не изменялись. В то же время варибельность параметра снизилась в I_{17,5}, за счет уменьшения доли нежизнеспособных клеток, и увеличилась в II_{17,5}, в котором возросла доля как нежизнеспособных клеток, так и клеток с максимальной ФА. К концу лог-фазы отмечено уменьшение значений F_v^u/F_m^u в двух контролях и увеличение CV в I_{17,5}. Через 4 ч в среде без биогенных элементов (III_{17,5-6}) значения F_v^u/F_m^u и CV существенно не изменились, однако прослеживалась тенденция к сни-

жению F_v^u/F_m^u и увеличению CV. Через сутки тенденция подтвердилась — F_v^u/F_m^u снизилась до средних значений, а варибельность параметра увеличилась в 2 раза, что обусловлено увеличением доли фотосинтетически неактивных клеток. Удельная (на клетку) фотосинтетическая фиксация углерода (P/N) в первые 4 ч после посева была ниже в контроле эксперимента III₃₅, однако через 24 ч P/N более снизилась в контроле III_{8,8} (табл. 4), что обусловлено большим приростом численности в контроле III_{8,8} и исчерпанием внутриклеточного запаса биогенных элементов. В стационарной фазе и фазе снижения численности в условиях лимитирования недостатком биогенных элементов F_v^u/F_m^u снижалась, а CV возрастал. Обращает на себя внимание присутствие клеток с высокой и даже максимальной ФА при очень низкой F_v/F_m .

Таблица 3

Относительная переменная флуоресценции в суспензии (F_v/F_m), средние значения относительной переменной флуоресценции отдельных клеток (F_v^u/F_m^u), коэффициент вариации F_v^u/F_m^u (CV) и доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции в контрольных культурах *A. ussurensis* на стадиях роста

Показатель		Лаг-фаза	Лог-фаза	Стационарная фаза	Фаза снижения численности
Длительность, сут	I _{17,5}	0–2	4–11	14–16	18–35
	II _{17,5}	0–2	4–11	14–19	21–23
<0,1	I _{17,5}	16–5	1–12	27–51	40–68
	II _{17,5}	2–8	12–11	23–37	70–83
0,1–0,29	I _{17,5}	5–3	3–20	28–9	26–20
	II _{17,5}	5–2	4–7	12–29	25–10
0,3–0,49	I _{17,5}	12–19	1–53	37–25	25–7
	II _{17,5}	0–6	3–20	40–28	5–7
0,5–0,59	I _{17,5}	18–32	39–12	7–15	9–3
	II _{17,5}	33–17	4–42	22–4	0–0
≥0,6	I _{17,5}	49–41	56–3	1–0	0–2
	II _{17,5}	60–67	77–20	3–2	0–0
F_v/F_m	I _{17,5}	0,52–0,64	0,66–0,49	0,40–0,33	0,28–0,09
	II _{17,5}	0,57–0,72	0,66–0,56	0,37–0,25	0,27–0,11
F_v^u/F_m^u	I _{17,5}	0,48–0,52	0,58–0,35	0,25–0,21	0,21–0,10
	II _{17,5}	0,57–0,56	0,56–0,45	0,32–0,20	0,07–0,05
CV, %	I _{17,5}	50–30	17–49	71–107	94–160
	II _{17,5}	21–34	42–42	62–86	160–204

Средние значения (F_v^n/F_m^n), коэффициент вариации (CV), доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции и удельная (на клетку) фотосинтетическая фиксация углерода (P/N) в контроле (III_{17,5-6}) экспериментов III_{8,8} и III₃₅

Показатель	III _{8,8}	III ₃₅	III _{8,8}	III ₃₅	III _{8,8}	III ₃₅	III _{8,8}	III ₃₅
Время, ч	0 (инокулят)		4		24		48	
F_v^n/F_m^n	0,56	0,60	0,52	0,59	0,37	0,42	0,52	0,54
CV, %	33	17	42	22	81	48	42	17
<0,1	9	2	13	3	38	17	14	1
0,1–0,29	1	0	2	2	3	3	4	2
0,3–0,49	2	2	2	1	2	31	5	11
0,5–0,59	22	19	24	23	13	46	17	68
≥0,6	66	77	59	71	44	3	60	18
$P/N \cdot 10^{-9}$, мгС/кл·ч	—	—	15,3	9,2	6,0	9,9	5,3	5,5

В гипосмотических условиях наблюдалось увеличение лаг-фазы до 18 сут в эксперименте I_{8,8} и до 7 сут в монокультуре эксперимента II_{8,8} (рис. 1а). Подобное удлинение лаг-фазы при акклиматизации к понижению солености ранее наблюдалось как у *A. issurensis* [1], так и у других видов диатомовых и динофитовых водорослей [22]. В течение лаг-фазы в эксперименте I_{8,8} значения F_v^n/F_m^n изменялись в диапазоне от среднего до низкого уровня; в эксперименте II_{8,8} — сохранялись на среднем уровне (табл. 5). Невысокие значения F_v^n/F_m^n свидетельствуют о пониженной ФА клеток и, как следствие, задержке деления. Вариабельность параметра в конце лаг-фазы, увеличившись в I_{8,8} и снизившись в II_{8,8}, достоверно различалась между экспериментами в 3 раза; при этом различие средних значений F_v^n/F_m^n оказалось статистически незначимым, что обусловлено различным распределением клеток по F_v^n/F_m^n . Через 4 часа в среде с добавлением биогенных элементов (III_{8,8+6}) значения F_v^n/F_m^n снизились, CV — возросли. Через 24 ч F_v^n/F_m^n и CV не изменились (табл. 6). В начале лог-фазы средние

значения F_v^n/F_m^n не изменились в эксперименте II_{8,8} и увеличились в I_{8,8}, степень варьирования достоверно не изменилась в обоих экспериментах. К концу лог-фазы в I_{8,8} среднее значение F_v^n/F_m^n не изменилось, однако его варьирование снизилось за счет уменьшения доли нежизнеспособных клеток; в II_{8,8} отмечено снижение F_v^n/F_m^n . Через 4 ч в среде без добавления биогенных элементов (III_{8,8-6}) возросли значения F_v^n/F_m^n , а через 24 ч также увеличилась вариабельность. Через 24 ч значения F_v^n/F_m^n и CV не отличались от контроля. В среде без внесения биогенных элементов в первые 4 ч P/N была выше по сравнению с III_{8,8+6}, однако через 24 ч (аналогично контролю) значительно снизилась вследствие исчерпания внутриклеточного запаса биогенных элементов, что подтверждает и отсутствие роста численности (табл. 6). В III_{8,8+6} интенсификация P/N наблюдалась на фоне увеличения численности. Через 48 ч между III_{8,8+6} и III_{8,8-6} P/N не различалась. В стационарной фазе и фазе снижения численности аналогично контролю средние значения F_v^n/F_m^n снизились, степень варьирования увеличилась.

Таблица 5

Относительная переменная флуоресценции в суспензии (F_v/F_m), средние значения относительной переменной флуоресценции отдельных клеток (F_v^n/F_m^n), коэффициент вариации F_v^n/F_m^n (CV) и доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции в культурах *A. ussurgensis*, росших при солености 8,8‰, на стадиях роста

Показатель		Лог-фаза	Лог-фаза	Стационарная фаза	Фаза снижения численности
Длительность, сут	I _{8,8}	0–18	21–23	25–28	31–35
	II _{8,8}	0–7	9–14	16–21	23–25
<0,1	I _{8,8}	27–43	22–4	11–38	60–60
	II _{8,8}	16–5	15–16	20–54	50–60
0,1–0,29	I _{8,8}	11–7	4–5	11–18	23–27
	II _{8,8}	7–4	5–9	35–32	29–23
0,3–0,49	I _{8,8}	47–5	7–14	30–26	14–11
	II _{8,8}	18–36	36–52	43–14	18–13
0,5–0,59	I _{8,8}	13–10	31–43	36–12	2–2
	II _{8,8}	41–50	40–21	2–0	3–4
≥0,6	I _{8,8}	2–35	36–34	12–6	1–0
	II _{8,8}	18–5	4–2	0–0	0–0
F_v/F_m	I _{8,8}	0,57–0,50	0,66–0,62	0,57–0,39	0,26–0,09
	II _{8,8}	0,57–0,56	0,54–0,47	0,31–0,11	0,20–0,20
F_v^n/F_m^n	I _{8,8}	0,29–0,31	0,44–0,52	0,42–0,24	0,12–0,11
	II _{8,8}	0,43–0,46	0,40–0,37	0,25–0,11	0,15–0,11
CV, %	I _{8,8}	69–94	57–29	46–91	129–133
	II _{8,8}	51–30	48–48	63–105	104–139

Таблица 6

Средние значения (F_v^n/F_m^n), коэффициент вариации (CV), доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции и удельная (на клетку) фотосинтетическая фиксация углерода (P/N) в гипосмотических условиях (эксперимент III_{8,8})

Показатель	III _{8,8+6}		III _{8,8-6}		III _{8,8+6}		III _{8,8-6}	
	III _{8,8+6}	III _{8,8-6}	III _{8,8+6}	III _{8,8-6}	III _{8,8+6}	III _{8,8-6}	III _{8,8+6}	III _{8,8-6}
Время, ч	2		4		24		48	
F_v^n/F_m^n	0,60	0,45	0,53	0,52	0,56	0,45	0,58	0,51
CV, %	19	53	36	39	33	60	27	31
<0,1	3	21	9	11	9	25	6	8
0,1–0,29	0	1	4	3	0	2	1	1
0,3–0,49	1	7	1	3	2	2	0	11
0,5–0,59	21	48	39	37	12	23	16	60
≥0,6	75	23	47	46	77	48	77	20
$P/N \cdot 10^{-9}$, мгС/кл·ч	–	–	10,7	13,1	12,1	5,6	2,8	2,3

В условиях гиперосмотического стресса кривые роста *A. issurensis* характеризовались отсутствием стационарной фазы (рис. 1в). В лаг-фазе и начале лог-фазы опытов I₃₅ и II₃₅ в отличие от контроля средние значения F_v^n/F_m^n увеличились, а вариабельность параметра снизилась. Через 4 ч в среде с добавлением биогенных элементов (III₃₅₊₆) значения F_v^n/F_m^n и CV достоверно не изменились. Через 24 ч отмечено увеличение вариабельности (табл. 7, 8). С середины лог-фазы и до конца культивирования в I₃₅ и II₃₅ значения F_v^n/F_m^n снижались, а вариабельность возрастала за счет уменьшения доли клеток с максимальной ФА и увеличения доли нежизнеспособных клеток. В конце лог-фазы в I₃₅ и II₃₅ при тождественных средних значениях F_v^n/F_m^n

распределение клеток и вариабельность были различны. Через 4 ч в среде без биогенных элементов (III₃₅₋₆) CV снизился (увеличение F_v^n/F_m^n — недостоверно). Через сутки средние значения F_v^n/F_m^n не отличались от гипоосмотических условий и были выше контроля; CV не отличался как от контроля, так и гипоосмотических условий. ρ/N в первые 4 ч была выше в среде с добавлением биогенных элементов. Через сутки в III₃₅₊₆ ρ/N не изменилась и увеличилась через 48 ч, что отличается от динамики в гипоосмотических условиях. В среде без добавления биогенных элементов, как и в контроле, через 24 ч наблюдалась интенсификация ρ/N ; однако через 48 ч вследствие исчерпания внутриклеточного запаса биогенных элементов снизилась аналогично контролю.

Таблица 7

Относительная переменная флуоресценции в суспензии (F_v/F_m), средние значения относительной переменной флуоресценции отдельных клеток (F_v^n/F_m^n), коэффициент вариации F_v^n/F_m^n (CV) и доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции в культурах *A. issurensis*, росших при солености 35‰, на стадиях роста

Показатель		Лаг-фаза	Лог-фаза	Фаза снижения численности
Длительность, сут	I ₃₅	0–2	4–14	16–35
	II ₃₅	0–2	4–16	18–21
<0,1	I ₃₅	15–9	3–4	20–60
	II ₃₅	28–31	12–22	26–81
0,1–0,29	I ₃₅	3–3	3–10	8–25
	II ₃₅	30–3	2–7	11–14
0,3–0,49	I ₃₅	6–19	1–60	49–9
	II ₃₅	30–2	0–18	26–4
0,5–0,59	I ₃₅	22–38	26–23	23–4
	II ₃₅	10–3	2–33	30–0
≥0,6	I ₃₅	54–31	67–3	0–2
	II ₃₅	2–61	84–20	7–1
F_v/F_m	I ₃₅	0,50–0,60	0,66–0,50	0,43–0,12
	II ₃₅	0,32–0,63	0,70–0,56	0,51–0,09
F_v^n/F_m^n	I ₃₅	0,51–0,50	0,58–0,42	0,34–0,12
	II ₃₅	0,25–0,44	0,59–0,40	0,33–0,05
CV, %	I ₃₅	46–38	23–31	56–132
	II ₃₅	75–70	38–59	69–207

Таблица 8

Средние значения (F_v^n/F_m^n), коэффициент вариации (CV), доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции и удельная (на клетку) фотосинтетическая фиксация углерода (P/N) в гиперосмотических условиях (эксперимент III₃₅)

Показатель	III ₃₅₊₆	III ₃₅₋₆	III ₃₅₊₆	III ₃₅₋₆	III ₃₅₊₆	III ₃₅₋₆	III ₃₅₊₆	III ₃₅₋₆
Время, ч	2		4		24		48	
F_v^n/F_m^n	0,48	0,51	0,52	0,57	0,48	0,54	0,56	0,55
CV, %	51	42	43	23	60	35	33	24
<0,1	18	14	13	4	26	10	9	3
0,1–0,29	5	0	4	0	0	1	1	4
0,3–0,49	4	5	6	5	2	3	1	7
0,5–0,59	16	34	23	38	6	31	17	41
≥0,6	57	47	54	53	66	55	72	45
$P/N \cdot 10^{-9}$, мгС/кл·ч	—	—	8,3	6,3	8,4	8,5	12,7	7,4

В смешанной культуре, росшей при солености 8,8‰, в популяции *A. ussurensis* степень варьирования F_v^n/F_m^n в лаг-фазе и фазе снижения численности превышала таковую в монокультуре, в то время как средние значения F_v^n/F_m^n не различались (табл. 9). В лог-фазе при одинаковой вариабельности значения F_v^n/F_m^n были выше в смешанной культуре. В стационарной фазе между моно- и смешанной культурами значения F_v^n/F_m^n и CV не

различались. Как отмечалось выше, в смешанной культуре в гиперосмотических условиях численность *A. ussurensis* увеличивалась незначительно. В смешанной культуре в лаг-фазе средние значения F_v^n/F_m^n превышали таковые в монокультуре, существенно не отличались в лог-фазе и были ниже в конце стационарной фазы и начале фазы снижения численности. Степень варьирования F_v^n/F_m^n между моно- и смешанной культурами не различалась.

Таблица 9

Средние значения относительной переменной флуоресценции отдельных клеток (F_v^n/F_m^n), коэффициент вариации F_v^n/F_m^n (CV) и доля клеток (%) с разной относительной переменной флуоресценции в смешанных культурах *A. ussurensis*, росших при солености 8,8‰ и 35‰, на стадиях роста

Показатель		Лаг-фаза	Лог-фаза	Стационарная фаза	Фаза снижения численности
Длительность, сут	II _{8,8}	0–7	9–11	14–16	18–23
	II ₃₅	0–2	4–7	9–16	18–21
<0,1	II _{8,8}	29–7	11–9	18–30	37–94
	II ₃₅	20–28	21–22	15–44	44–78
0,1–0,29	II _{8,8}	6–2	5–4	6–23	32–5
	II ₃₅	13–1	3–4	7–13	13–16
0,3–0,49	II _{8,8}	8–8	10–10	34–39	24–1
	II ₃₅	38–5	1–10	8–14	21–5
0,5–0,59	II _{8,8}	24–65	47–40	36–8	6–0
	II ₃₅	25–11	4–11	6–15	15–1
≥0,6	II _{8,8}	33–18	27–37	6–0	1–0
	II ₃₅	4–55	71–53	64–14	7–0
F_v^n/F_m^n	II _{8,8}	0,39–0,51	0,49–0,51	0,39–0,25	0,19–0,02
	II ₃₅	0,35–0,45	0,50–0,46	0,50–0,26	0,24–0,06
CV, %	II _{8,8}	68–30	40–36	52–75	92–284
	II ₃₅	56–64	54–58	49–98	100–194

Обсуждение

Усредненные величины F_v^n/F_m^n при всех условиях солености были несколько ниже значений F_v/F_m , измеренных в суспензии клеток, независимо от наличия или отсутствия стрессовых условий. Различия в оценках могут быть связаны с использованием разных светофильтров в флуориметрах при регистрации флуоресценции в суспензии и под микроскопом [3], а также присутствием фотосинтетически неактивных клеток. Учет таких клеток снижает средние значения F_v^n/F_m^n , в то время как на величину F_v/F_m они практически не влияют [13]. Аналогичным образом средние значения F_v^n/F_m^n были ниже F_v/F_m у антарктического фитопланктона [18].

Гетерогенность популяций *A. ussurensis* по F_v^n/F_m^n выявлена как в условиях осмотического стресса, так и в его отсутствие. Обращает на себя внимание присутствие нежизнеспособных клеток в контрольных популяциях, не испытывающих осмотический стресс. Доля нежизнеспособных клеток составляет 1–16%, что согласуется с видоспецифичностью доли мертвых клеток в культурах водорослей [25]. Подобная картина наблюдалась ранее у *S. weissflogii* [4]. Уже в оптимальных условиях при сходных значениях F_v/F_m в суспензии выявляются различия в степени гетерогенности контрольных популяций по значениям F_v/F_m индивидуальных клеток. Различие фотосинтетических параметров отдельных клеток свидетельствует о функциональной неоднородности в пределах одной популяции.

В накопительных культурах по мере роста водорослей и изъятия ими ресурсов из среды концентрация биогенных элементов снижается до порогового уровня, при котором потребление необходимых ресурсов уже невозможно. Соотношение содержания азота и фосфора в среде $f/2$ равняется 1:18, что, согласно общепринятым взглядам [21], обуславливает ограничение развития водорослей недостатком азота. Дальнейшее накопление биомассы идет за счет внутриклеточных запасов азота. По мере исчерпания запасов возрастает степень азотного лимитирования культур. В условиях лимитирования недостатком биогенных элементов значение F_v/F_m в суспензии клеток и усредненная для популяции величина F_v^n/F_m^n не превышали 0,14. Низкие значения ($F_v^n/F_m^n=0,10$) были отмечены в условиях лимитирования недостатком азота у диатомеи *S. weissflogii* [3], что обусловлено подавлением синтеза белков и пигментов на уровне трансляции и в целом нарушением работы фотосинтетического аппарата при клеточном дефиците азота [11]. В условиях лимитирования недостатком биогенных элементов при отсутствии осмотического стресса в популяции *A. ussurensis* отмечалась высокая вариабельность клеток по F_v^n/F_m^n ($CV>120\%$). Причинами поддержания генотипической

неоднородности могут являться спонтанный мутагенез [15] и стохастические процессы [10]. Кроме того, существующая внутривидовая генетическая изменчивость, эпигенетические факторы создают основу генетической и физиологической неоднородности популяции [16, 20].

Удельная фотосинтетическая фиксация углерода в первые сутки была выше при акклимации к гипоосмотическому стрессу, а во вторые — гиперосмотическому. Гиперосмотический стресс вызывает у диатомовых водорослей повышенное образование активных форм кислорода, которые окисляют пигменты, белки, а также мембраны тилакоидов, что ведет к снижению ФА в первые сутки [12]. В то же время при повышении солености в клетках идет синтез осмолитов [7], что, вероятно, с другой стороны, обуславливает более интенсивную фотосинтетическую фиксацию углерода по сравнению с гипоосмотическими условиями во вторые сутки.

Как гипо-, так и гиперосмотический стресс в начале акклимации вызвал увеличение вариабельности параметра по сравнению с контролем, что косвенно свидетельствует о протекающих в клетках процессах осмоакклимации. Между гипо- и гиперосмотическими условиями в этот период вариабельность различалась незначительно. В условиях лимитирования недостатком биогенных элементов высокая вариабельность отмечена при всех условиях солености.

Гипоосмотический стресс в начале акклимации в смешанной культуре за счет увеличения доли нежизнеспособных клеток вызвал увеличение вариабельности F_v^n/F_m^n по сравнению с монокультурой, что не наблюдалось в контроле и 35‰ среде. Указанное различие, по-видимому, обусловлено задержкой лаг-фазы в гипоосмотических условиях. У совместно растущей водоросли *S. weissflogii* значения CV были ниже, чем в популяции *A. ussurensis*, как в гипоосмотических условиях (в течение лаг-фазы), так и гиперосмотических (в течение всего культивирования). Аналогичная тенденция наблюдалась при оценке вариабельности объемов клеток при совместном росте этих видов [5].

Заключение

В популяции *A. ussurensis* клетки различаются по способности акклимироваться к осмотическому стрессу — ФА у одних клеток остается на максимальном уровне, тогда как у других проявляются нарушения в работе фотосинтетического аппарата. В процессе акклимации вариабельность клеток по F_v^n/F_m^n снижается. На степень гетерогенности в большей мере влияет осмотический стресс и наличие биогенных элементов, чем присутствие возможного конкурента диатомовой водоросли *S. weissflogii*.

Литература

1. Айздайчер Н.А., Стоник И.В. Влияние солености морской воды на виды рода *Attheya* West (Bacillariophyta) из Японского моря (Россия) // Альгология. — 2013. — Т. 23. — № 1. — С. 37–46.
2. Белевич Т.А., Запара Е.В., Ильяш Л.В. Взаимодействие между планктонными водорослями при разных источниках азота // Усп. совр. биол. — 2009. — Т. 129. — № 4. — С. 379–385.
3. Воронова Е.Н., Ильяш Л.В., Погосян С.И. и др. Внутрипопуляционная гетерогенность параметров флуоресценции у морской планктонной водоросли *Thalassiosira weissflogii* при разной обеспеченности азотом // Микробиология. — 2009. — Т. 78. — № 4. — С. 469–478.
4. Курочкина В.А., Белевич Т.А., Погосян С.И., Ильяш Л.В. Изменчивость флуоресценции отдельных клеток водоросли *Sonticribra weissflogii* при осмотическом стрессе // Вода: химия и экология. — 2013. — № 2. — С. 71–76.
5. Курочкина В.А., Ткебучава Л.Ф. Внутрипопуляционная гетерогенность объемов клеток водоросли *Attheya ussurensis* в условиях стресса // Изв. ТИПРО. — 2016. — Т. 185. — С. 132–145.
6. Радченко И.Г., Ильяш Л.В. Рост и фотосинтетическая активность диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* при снижении солености // Изв. АН. Сер. биол. — 2006. — № 3. — С. 306–313.
7. Bisson M.A., Kirst G.O. Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae // Naturwissenschaften. — 1995. — Vol. 82. — P. 461–471.
8. Bucci V., Nunez-Milland D., Twining D.S., Hellweger F.L. Microscale patchiness leads to large and important intraspecific internal nutrient heterogeneity in phytoplankton // Aquat. Ecol. — 2012. — Vol. 46. — P. 101–118.
9. Cifuentes A.S., Gonzalez M.A., Inostroza I., Aguilera A. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient // J. Phycol. — 2001. — Vol. 37. — P. 334–344.
10. Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S. Stochastic gene expression in a single cell // Science. — 2002. — Vol. 297. — P. 1183–1186.
11. Falkowski P.G., Raven J.A. Aquatic photosynthesis. — Malden, Massachusetts: Blackwell Science, 1997. — 375 p.
12. Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. Photooxidative stress in plants // Physiol. Plant. — 1994. — Vol. 92. — P. 696–717.
13. Franklin D.J., Choi C.J., Hughes C., Malin G., Berges J. Effect of dead phytoplankton cells on the apparent efficiency of photosystem II // Mar. Ecol. Prog. Ser. — 2009. — Vol. 382. — P. 35–40.
14. Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies on marine diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // Can. J. Microbiol. — 1962. — Vol. 8. — P. 229–239.
15. Iglesias-Rodriguez M.D., Schofield O.M., Bailey J., Medlin L.K., Hayes P.K. Intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae): the use of microsatellite analysis in marine phytoplankton population studies // J. Phycology. — 2006. — Vol. 42. — P. 526–536.
16. Maumus F., Rabinowicz P., Bowler C., Rivarola M. Stemming epigenetics in marine stramenopiles // Current Genomics. — 2011. — Vol. 12. — No. 5. — P. 357–370.
17. Pelkmans L. Using cell-to-cell variability — a new era in molecular biology // Science. — 2012. — Vol. 336. — P. 425–426.
18. Peloquin J.A., Smith Jr. W.O. The role of phytoplankton size on photochemical recovery during the Southern Ocean Experiment // J. Phycol. — 2006. — Vol. 42. — P. 1016–1027.
19. Rijstenbil J.W., Wijnholds J.A., Sinke J.J. Implications of salinity fluctuations for growth and nitrogen metabolism of the marine diatom *Ditylum brightwellii* in comparison with *Skeletonema costatum* // Mar. Biol. — 1989. — Vol. 101(1). — P. 131–141.
20. Rynearson T.A., Armbrust E.V. Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae) // J. Phycol. — 2004. — Vol. 40. — P. 34–43.
21. Ryther J., Dunstan W.M. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment // Science. — 1971. — Vol. 171. — No. 3977. — P. 1008–1013.
22. Shikata T., Nagasoe S., Oh S-J. et al. Effects of down- and up-shocks from rapid changes of salinity on survival and growth of estuarine phytoplankters // J. Fac. Agr., Kyushu Univ. — 2008. — Vol. 53 — No. 1. — P. 81–87.
23. Steeman-Nielsen E. The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea // J. Cons. Int. Explor. Mer. — 1952. — Vol. 18. — No. 2. — P. 117–140.
24. Stonik I.V., Orlova T.Yu., Crawford R.M. *Attheya ussurensis* sp. nov. (Bacillariophyta) — a new marine diatom from the coastal waters of the Sea of Japan and a reappraisal of the genus // Phycol. — 2006. — Vol. 45. — P. 141–147.
25. Veldhuis M.J.W., Kraay G.W., Timmermans K.R. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth // Eur. J. Phycol. — 2001. — Vol. 36. — P. 167–177.

Список сокращений

F_v / F_m — относительная переменная флуоресценции в суспензии клеток,

F_v^n / F_m^n — относительная переменная флуоресценции индивидуальных клеток,

ФА — фотосинтетическая активность клеток,

P/N — удельная (на клетку) фотосинтетическая фиксация углерода,

CV — коэффициент вариации.

INTRAPOPULATION HETEROGENEITY OF FLUORESCENCE PARAMETERS OF DIATOM *ATTHEYA USSURENSIS* UNDER OSMOTIC STRESS

V.A. KUROCHKINA, T.A. BELEVICH, L.F. TKEBUCHAVA

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The relative variable fluorescence was estimated in individual cells (F_v^i/F_m^i) of diatom *Attheya ussurensis* at different growth stages after transfer to media with salinity 8,8 ‰ (hypo-osmotic conditions), 35 ‰ (hyperosmotic conditions) and 17,5 ‰ (control) under conditions change in the concentration of biogenic elements and interaction with the population of diatom *Conticribra weissflogii*. The specific photosynthetic carbon fixation (P/N) was measured within 48 hours after reseeded. Heterogeneity of populations *A. ussurensis* on F_v^i/F_m^i was revealed in conditions of osmotic stress, as well as in its absence. At the beginning of the acclimation hypo- and hyperosmotic stress caused the increase of variability F_v^i/F_m^i as compared with the control. Under the conditions of limiting by deficiency of biogenic elements the high variability F_v^i/F_m^i was marked at all salinity conditions. This parameter in the presence of a possible competitor has less effect on intrapopulation heterogeneity than osmotic stress and the presence of biogenic elements. In the process of acclimation the variability in F_v^i/F_m^i cells was decreased. P/N was higher in acclimation to hypo-osmotic stress on the first day, while the second day – to hyperosmotic stress.

Keywords: diatom, *Attheya ussurensis*, fluorescence, population heterogeneity, osmotic stress.

ИНВЕРТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОДУЦЕНТОВ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ – ШТАММОВ *ASPERGILLUS NIGER* – НА МЕЛАССЕ И ГИДРОЛИЗАТАХ КРАХМАЛА

Н.Ю. ШАРОВА*, Т.В. ВЫБОРНОВА, А.И. КИЛЕЕВА, А.Р. ЮШКАУСКАЙТЕ

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок»,
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург

Продуценты лимонной кислоты – штаммы микромицета *Aspergillus niger* обладают повышенной способностью к синтезу гидролитических ферментов в качестве дополнительных целевых метаболитов при глубинном способе культивирования на углеводсодержащих субстратах. В статье представлены результаты исследований инвертазной активности при ферментации штаммами *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 меласной среды и гидролизатов крахмала. Интрацеллюлярная инвертазная активность на 120 ч биотехнологического процесса в пересчете на 1 г мицелия (влажность 10%) в результате ферментации меласной среды составила 405 ± 10 ед./г для штамма Л-4 и 398 ± 19 ед./г для штамма В-3. При ферментации гидролизатов крахмала с ДЕ, равным $12,5 \pm 0,1\%$, $38,1 \pm 0,1\%$ и $52,1 \pm 0,1\%$, инвертазная активность варьировала от 239 ± 28 ед./г до 391 ± 31 ед./г для штамма Л-4 и от 271 ± 24 ед./г до 345 ± 25 ед./г для штамма В-3. Экстрацеллюлярная инвертазная активность в результате 120-часовой ферментации меласной среды составила $0,183 \pm 0,012$ ед./см³ для штамма Л-4, $0,194 \pm 0,011$ ед./см³ для штамма В-3. В опытах с использованием гидролизатов крахмала показатель находился в пределах от $0,257 \pm 0,014$ ед./см³ до $0,357 \pm 0,027$ ед./см³ для Л-4, от $0,263 \pm 0,012$ ед./см³ до $0,297 \pm 0,027$ ед./см³ – для В-3.

Ключевые слова: штаммы *Aspergillus niger* Л-4 и В-3, продуценты лимонной кислоты, инвертазная активность, меласная среда, гидролизаты крахмала.

Введение

Инвертаза (β -D-фруктофуранозидаза, ЕС 3.2.1.26) является одним из широко используемых промышленных ферментов. Этот фермент способен катализировать гидролиз раффинозы и стахиозы, может быть использован для получения фруктоолигосахаридов в качестве пребиотиков. Инвертаза допускается к использованию в производстве пищевых продуктов и носит статус пищевой добавки Е 1103, разрешенной к применению в странах ЕС. Фермент предотвращает кристаллизацию сахаров в кондитерских изделиях, способствует замедлению процесса брожения в технологиях, использующих высокие концентрации сахара, стабилизации консистен-

ции, усилению вкусовых качеств, продлению сроков хранения готовой продукции. В качестве вспомогательного технологического средства инвертаза используется для гидролиза сахарозы при получении инвертированного сиропа, этанола и фруктозы из сахарозы [4, 8].

Нарушение секреции инвертазы или снижение ее активности в здоровом организме может привести к замедлению переваривания сахарозы и, как следствие, спровоцировать брожение и повысить риск интоксикации. Таким образом, инвертаза помогает защитить организм от нарушений переваривания пищи (мальдигестия) и всасывания пищевых веществ (мальабсорбция) в кишечнике, от язв и многих других заболеваний пищеварительного тракта [2]. Распространенным методом лечения таких последствий является заместительная ферментная терапия [5].

За рубежом промышленные препараты инвертазы получают в основном с помощью дрожжей [20, 21]. В России этот фермент не производится, имеются сведения о лабораторных исследованиях в данном направлении [1, 10].

Наиболее детально изученными продуцентами инвертазы являются культуры *Saccharomyces*,

© 2016 г. Шарова Н.Ю., Выборнова Т.В., Килеева А.И., Юшкаускайте А.Р.

* Автор для переписки:

Шарова Наталья Юрьевна

д.т.н., профессор, заведующий лабораторией биотехнологии производства лимонной кислоты ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок»

E-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Leucosporidium, *Candida utilis*, представители *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Stretomyces*, *Penicillium*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus*. Аспергиллы, такие как *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, продуктивно синтезируют инвертазу при глубокой и твердофазной ферментации отходов переработки сельскохозяйственной продукции и пищевого сырья [18, 22, 23].

Коллекция микроорганизмов ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок» (ФГБНУ ВНИИПД) располагает штаммами *Aspergillus niger* — продуцентами лимонной и глюконовой кислот, которые являются пищевыми микроингредиентами. Промышленные штаммы Л-4 и В-3 при ферментации гидролизатов крахмалсодержащего сырья синтезируют амилитические ферменты, которые составляют наибольший объем потребления в России и из которых более 50% импортного производства [9]. Инвертазная активность для этих штаммов при ферментации сахаросодержащих субстратов сопоставима с инвертазной активностью для изученных культур *Aspergillus*, растущих в кислой среде [15].

Целью данной работы является исследование инвертазной активности при культивировании штаммов *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 на мелассной среде и гидролизатах крахмала.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись штаммы-кислотообразователи микромицета *Aspergillus niger* Л-4 и В-3, селекционированные в институте соответственно для ферментации мелассы и концентрированного сока сорго [13, 11].

Ферментацию проводили периодическим способом по технологии концентрированных сред в условиях шейкера-инкубатора Multitron (INFORS, Швейцария) в колбах вместимостью 750 см³ при температуре 36±1 °С — на стадии получения посевного мицелия, при 32±1 °С — на стадии ферментации. Посевной мицелий переводили на стадию ферментации в возрасте 48 ч и в количестве 10% от исходного объема питательной среды.

В качестве источника углерода исследовали свежесловачную мелассу (ГОСТ 30561-2013) и кукурузный крахмал (ГОСТ 32159-2013), источника азота — нитрат аммония (ГОСТ 22867-77). Гидролиз крахмала до степени гидролиза, обеспечивающей декстрозный эквивалент ДЕ=12–52%, проводили способом, описанным в [12].

Состав среды: углеводный субстрат — 50 г/дм³ (на стадии получения посевного мицелия) и 150 г/дм³ (на стадии ферментации); нитрат аммония (NH₄NO₃) — 2,5 г/дм³; сульфат магния семиводный (MgSO₄·7H₂O) — 0,25 г/дм³; фосфат калия однозамещенный (KH₂PO₄) — 0,16 г/дм³; вода до 1 дм³; рН 6,5 [7]. Посевной мицелий переводили на стадию ферментации в возрасте 48 ч и в количестве 10% от исходного объема питательной среды.

Инвертазную активность оценивали колориметрическим методом [14]. Количество кислоты определяли титриметрическим методом [6].

Обработку экспериментальных данных проводили с привлечением методов математической статистики и программ Excel XP.

Результаты и обсуждение

Инвертаза является индуцибельным ферментом и продуктивно синтезируется при культивировании аспергиллов на средах, содержащих сахарозу и продукты ее гидролиза (глюкоза, фруктоза). К ним относятся, в частности, мелассная и сахарозо-минеральная среды, которые используются для получения лимонной кислоты в производственных условиях [15]. Основной углеводный субстрат в мелассе и кристаллическом сахаре — это сахароза (соответственно 48–62% [7] и 99,5–99,8% согласно ГОСТ 33222-2015). Гидролизаты крахмала содержат глюкозу, которая является структурной единицей в молекуле сахарозы. Количество глюкозы в них варьирует (табл. 1). Глюкоза, по данным ряда исследователей, индуцирует синтез инвертазы [17, 25]. При глубокой ферментации сахарозо- и глюкозосодержащих субстратов идентифицируется интрацеллюлярная и экстрацеллюлярная инвертазная активность [24, 25].

Таблица 1
Составы гидролизатов кукурузного крахмала

ДЕ, %	Доля углеводов в сумме сахаров в гидролизатах, %		
	глюкоза	мальтоза	декстрины
12,5±0,1	1,8±0,1	10,3±0,1	87,9±0,1
31,8±0,1	4,4±0,1	27,4±0,1	68,2±0,1
52,3±0,1	6,8±0,2	49,1±0,3	44,1±0,3

Как показали ранее проведенные исследования, при культивировании продуцентов Л-4 и В-3 на сахарозо- и глюкозосодержащих субстратах инвертазная

активность идентифицируется как в нативном растворе, так и в мицелии [15]. На сахарозоминаральной среде для штамма Л-4 пик интрацеллюлярной инвертазной активности приходится на 72 ч процесса, для штамма В-3 — на 24–48 ч [15].

В результате исследований при культивировании на меласной среде для обоих штаммов интенсивное накопление инвертазной активности внутри клетки было отмечено на 48 ч процесса (рис. 1). Интенсивность биосинтеза инвертазы при ферментации гидролизатов крахмала зависела от содержания в них глюкозы, мальтозы и декстринов. Пик инвертазной активности при ферментации гидролизата с $DE=52,3\pm 0,1\%$ выявлен на 24 ч процесса, гидролизатов с меньшей степенью гидролиза — на 48 ч (рис. 2, приведены данные для штамма Л-4).

Меласная среда, согласно традиционной технологии концентрированных сред, изначально содержит 5% сахара, а на вторые-третьи сутки ферментации в культуральную среду дополнительно вводится меласса в количестве, обеспечивающем массовую долю сахара 15%. То есть в культуральной среде увеличивается содержание индуктора синтеза инвертазы, которое способствует активизации синтеза фермента. В среде, содержащей гидролизат крахмала, исходная массовая концентрация углеводного субстрата на стадии ферментации, как и в сахарозоминаральной среде, составляет 150 г/дм^3 . Соответственно содержание индуцирующего компонента в них повышено по сравнению с исходной меласной средой. В сравнении с процессом на сахарозоминаральной среде накопление инвертазной активности в клетке протекает менее интенсивно.

Гидролизаты крахмала являются многокомпонентными источниками углерода, при культивировании на которых аспергиллы потребляют глюкозу, изначально присутствующую в питательной среде, и глюкозу, образующуюся в результате действия собственных амилолитических ферментов, синтезируемых продуцентом в процессе ферментации [3]. Глюкоза расходуется на накопление биомассы, участвует в биохимических реакциях цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). При более глубоком гидролизе крахмала в гидролизатах увеличивается массовая доля глюкозы. Соответственно ее исходное содержание в культуральной среде повышается. По мере гидролиза декстринов и мальтозы среды в процессе ферментации до глюкозы активизируется синтез фермента с инвертазной активностью. В результате изучения процесса биотрансформации глюкозы, мальтозы и декстринов в культуральной среде установлено, что увеличение ин-

трацеллюлярной инвертазной активности приходится на период активного потребления продуцентом декстринов и накопления мальтозы (24–48 ч). Возможно, что инвертазную активность в данном случае проявляет не инвертаза, а α -глюкозидаза (α -D-глюкозид-глюкогидролаза; КФ 3.2.1.20), обладающая специфичностью действия в отношении мальтозы и способностью гидролизовать сахарозу. Как показали ранее проведенные исследования, α -глюкозидаза (мальтаза) синтезируется при ферментации гидролизатов крахмала [3].

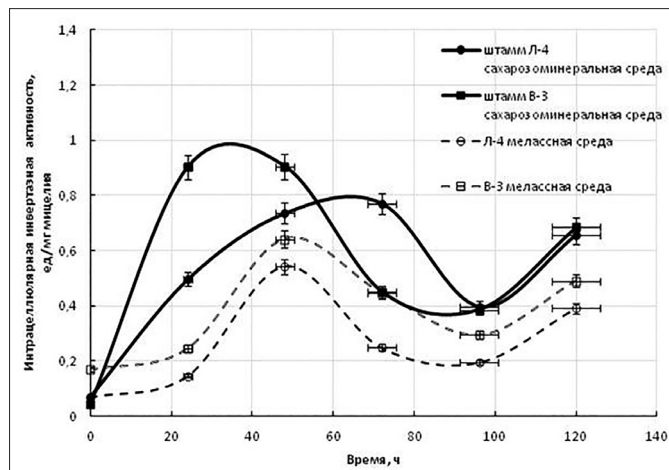


Рис. 1. Динамика активности интрацеллюлярной инвертазы при культивировании продуцентов лимонной кислоты — штаммов *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 на сахарозоминаральной и меласной средах (влажность мицелия 80%)

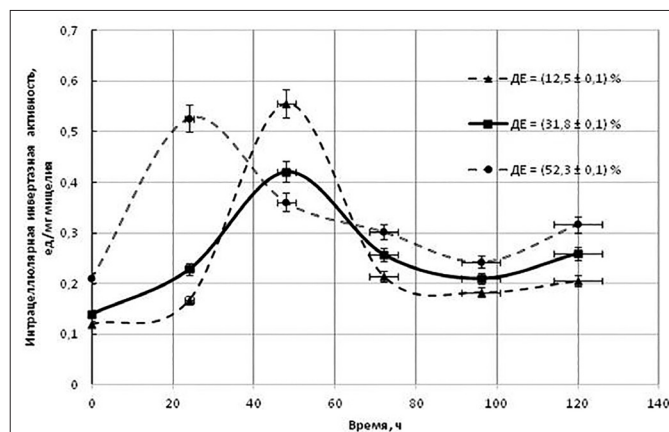


Рис. 2. Динамика интрацеллюлярной инвертазной активности при культивировании продуцента лимонной кислоты — штамма *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах кукурузного крахмала (влажность мицелия 80%)

Динамика экстрацеллюлярной активности, как показали исследования, носит иной характер (рис. 3, 4). Пул приходился на 48 ч для меласной среды и

гидролизата крахмала с $DE=52,3\pm 0,1\%$, на 72 ч — для гидролизатов крахмала с $DE=12,5\pm 0,1\%$ и $38,1\pm 0,1\%$. Скорость экскреции фермента с инвертазной активностью меньше по сравнению со скоростью ее синтеза и секреции в цитозоле (см. рис. 1–4). При ферментации сахарозоминаральной среды пик инвертазной активности в культуральной жидкости выявлен на 24–48 ч развития микромицета.

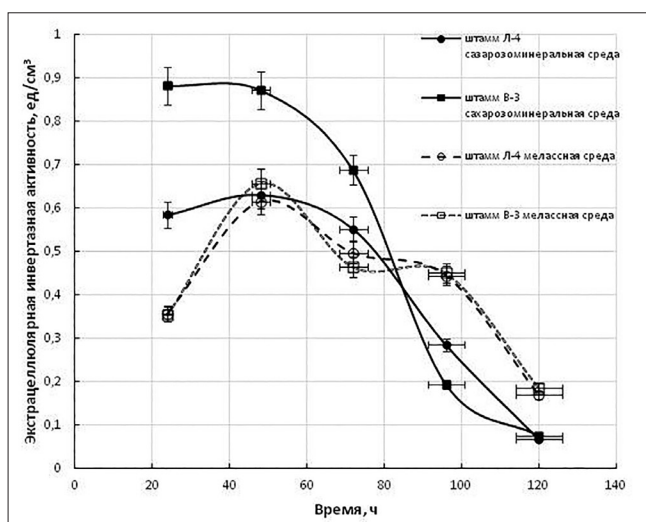


Рис. 3. Динамика активности экстрацеллюлярной инвертазы при культивировании продуцентов лимонной кислоты — штаммов *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 на сахарозоминаральной и мелассной средах

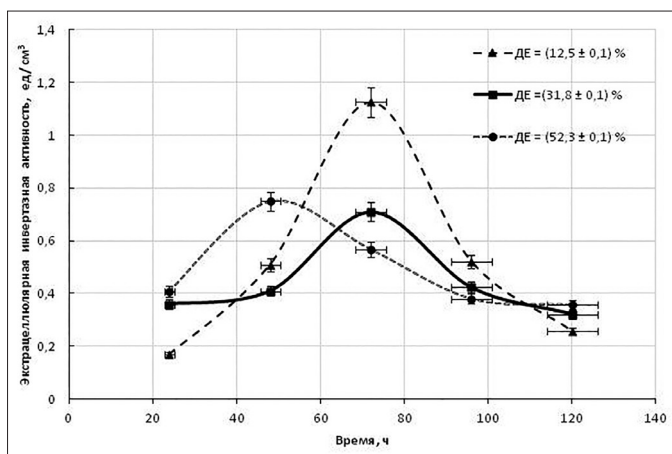


Рис. 4. Динамика экстрацеллюлярной инвертазной активности при культивировании продуцента лимонной кислоты — штамма *Aspergillus niger* Л-4 на гидролизатах кукурузного крахмала

Индуктируемый биосинтез фермента продолжается с увеличенной скоростью, пока не удаляется индуктор, затем скорость возвращается к начальному уровню. Так, для штамма *Aspergillus oryzae* IPT301 экстрацеллюлярная инвертазная активность в конце

цикла ферментации (72 ч) снижалась и составляла $0,0005–0,009$ ед./ $см^3$ [25]. Для некоторых культур аспергиллов характерно накопление фермента в клетках при культивировании на среде, содержащей в качестве углеводного источника только глюкозу [20, 21, 24]. Результаты исследований показали, что в период 96–120 ч культивирования штаммов *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 интрацеллюлярная активность повышается, а экстрацеллюлярная активность снижается (см. рис. 1–4). Для интрацеллюлярного фермента повышение активности обусловлено присутствием в среде до конца процесса мальтозы — индуктора синтеза α -глюкозидазы. Поскольку увеличение интрацеллюлярной инвертазной активности в конце биотехнологического процесса наблюдалось и при ферментации мелассы и кристаллического сахара (см. рис. 1), то, возможно, в данный период оно обусловлено замедленной экскрецией фермента во внеклеточное пространство, учитывая, что экстрацеллюлярная активность снижалась. Другим предположением может быть активная экскреция из клетки основного метаболита, лимонной кислоты, которая, накапливаясь в цитозоле, ингибирует активность фермента.

По мере экскреции лимонной кислоты из цитозоля взаимодействие фермента и субстрата-индуктора, поступающего в клетку, активизируется, что создает возможность продолжения процесса ферментации при дополнительном введении в культуральную среду углеводного источника. Изученные инвертазы аспергиллов являются в основном внеклеточными ферментами [17, 23]. В проведенных опытах из исследуемых углеводных субстратов наибольший уровень экстрацеллюлярной инвертазной активности получен при ферментации гидролизатов крахмала. Максимальная активность фермента $1,154\pm 0,128$ ед./ $см^3$ выявлена при ферментации гидролизата с $DE=12,5\pm 0,1\%$. В конце процесса (120 ч) наибольшая экстрацеллюлярная инвертазная активность получена при ферментации гидролизата крахмала с DE в пределах от 31,7 до 52,4% (табл. 2).

В сравнительном аспекте культура *Aspergillus caespitosus* при культивировании на крахмале на 120 ч процесса синтезирует инвертазу с активностью $0,20\pm 0,01$ ед./ $см^3$ [16]. Высокий уровень инвертазной активности достигнут при культивировании различных штаммов аспергиллов на более сложных по составу средах. Так, при ферментации отходов агропроизводств (пшеничные отруби, рисовая мезга, мука маниоки и др.) в зависимости от углеводного источника экстрацеллюлярная инвертазная активность находилась в пределах

от $0,20 \pm 0,01$ до $19,1 \pm 0,19$ ед./см³, интрацеллюлярная активность составляла от $0,10 \pm 0,01$ до $4,10 \pm 0,01$ ед./ (см³ мицелиальной суспензии) [16, 19]. Полученные экспериментальные данные по исследованию инвертазной активности в процессе ферментации гидролизатов крахмала штаммами аспергиллов, специально селекциониро-

ванных для синтеза лимонной кислоты, свидетельствуют о возможности повышения ферментативной активности и сохранения ее на достигнутом уровне до конца биотехнологического процесса в результате подбора источника углерода и сбалансированности углеводного состава питательной среды.

Таблица 2

Инвертазная активность в конце процесса ферментации (120 ч)

Наименование субстрата	Инвертазная активность			
	экстрацеллюлярная		интрацеллюлярная*	
	ед./см ³	суммарная, ед.	ед./г	суммарная, ед.
Штамм Л-4				
Меласса	$0,183 \pm 0,012$	$13,2 \pm 0,9$	405 ± 10	154 ± 17
Гидролизат крахмала				
ДЕ=12,5±0,1%	$0,257 \pm 0,014$	$20,8 \pm 1,1$	391 ± 22	152 ± 9
ДЕ=31,8±0,1%	$0,321 \pm 0,021$	$25,6 \pm 1,5$	239 ± 28	102 ± 11
ДЕ=52,3±0,1%	$0,357 \pm 0,027$	$24,2 \pm 1,9$	351 ± 31	147 ± 13
Сахар кристаллический	$0,086 \pm 0,004$	$5,5 \pm 0,3$	662 ± 21	252 ± 7
Штамм В-3				
Меласса	$0,194 \pm 0,011$	$13,9 \pm 0,8$	398 ± 19	160 ± 8
Гидролизат крахмала				
ДЕ=12,5±0,1%	$0,265 \pm 0,017$	$16,6 \pm 1,2$	342 ± 21	395 ± 9
ДЕ=31,8±0,1%	$0,297 \pm 0,027$	$26,4 \pm 1,9$	271 ± 24	333 ± 10
ДЕ=52,3±0,1%	$0,263 \pm 0,012$	$24,2 \pm 0,9$	345 ± 25	317 ± 10
Сахар кристаллический	$0,098 \pm 0,006$	$4,4 \pm 0,3$	435 ± 15	183 ± 6

Примечание: * — остаточная влажность мицелия 10%

Заключение

Таким образом, штаммы *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 при культивировании на мелассной среде, традиционной в производстве лимонной кислоты, и на гидролизатах крахмала обладают способностью синтезировать ферменты с инвертазной активностью. Данные о получении лимонной кислоты и инвертазы в качестве целевых пищевых ингредиентов и добавок в одном технологическом процессе в России и за рубежом отсутствуют. Полученные закономерности создают предпосылки для дальнейших исследований по направлению разработки «совмещенной» технологии этих микроингредиентов, внедрение которой позволит создать многопрофильное

производство отечественных пищевых добавок на основе микробных метаболитов на базе действующих заводов по производству лимонной кислоты и ферментов.

Литература

1. Букова В.Б. Разработка технологии получения б-D-фруктофуранозидазы *Aspergillus awamori*, штамм чешский: автореф. дис. ... канд. техн. наук МТИПП, 1983. — 36 с.
2. Коровина Н.А., Захарова И.Н. Применение ферментных препаратов при нарушениях пищеварения у детей // Лечащий врач. — 2006. — № 1. — С. 37–41.
3. Кулев Д.Х., Шарова Н.Ю. Биосинтез и выделение лимонной кислоты и амилолитических ферментов. — М.: ДеЛи принт, 2008. — 128 с.

4. Кулев Д.Х. Техническое регулирование пищевых ингредиентов на едином кономическом пространстве // Контроль качества продукции. — 2014. — № 8. — С. 27–35.
5. Кучма И.Ю. Ферментные препараты в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта // Провизор. — 2009. — Вып. 7. — С. 36–38.
6. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шуняева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие — Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. — 80 с.
7. Мушников Л.Н., Никифорова Т.А., Шарова Н.Ю., Позднякова Т.А. Физико-химический и микробиологический состав углеводсодержащего сырья — субстрата для биосинтеза лимонной кислоты // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2001. — № 7. — С. 7–9.
8. Назаренко М.Н. Исследование процесса ферментации инулина при производстве фруктозо-глюкозного сиропа // Научный журнал КубГАУ. — 2014. — № 98(04). — С. 1–13.
9. Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития Frost & Sullivan. 2014 — 70 с. <https://www.rusventure.ru>.
10. Островский Д.И., Рязанов Е.М., Бубнов А.В. Способ получения препарата инвертазы для гидролиза сахарозы. Патент РФ 2157844. Опубл. 20.10.2000. [Электронный ресурс] <http://ru-patent.info/21/55-59/2157844.html>.
11. Патент 2088658 Российская Федерация, МПК⁶ С 12 1/14, С 12 Р 7/48 (С 12 1/14, С 12 1/35). Штамм гриба *Aspergillus niger* — продуцент лимонной кислоты / Красикова Н.В., Никифорова Т.А., Галкин А.В., Финько В.М.; заявитель и патентообладатель: Санкт-Петербургский научно-исследовательский ин-т пищевых ароматизаторов, кислот и красителей — № 95116715; заявл. 27.09.95; опубл. 27.08.97.
12. Патент 2294371 Российская Федерация, МПК⁶ С12Р7/48, С12Н1/14, С12Р1/685. Способ получения лимонной кислоты и комплекса кислотостабильных амилолитических ферментов / Шарова Н.Ю. заявитель и патентообладатель: Санкт-Петербургский научно-исследовательский ин-т пищевых ароматизаторов, кислот и красителей — № 2005104519/13; заявл. 18.02.2005, опубл. 27.02.2007, Бюл. № 6.
13. Патент 975799 СССР, МКИ С 12 N 15/00, С 12 Р 7/48. Штамм гриба *Aspergillus niger* Л-4 — продуцент лимонной кислоты / Ермакова В.П., Финько В.М., Василицев И.М., Щербачева Е.Я., Шушкевич Т.И.; заявитель и патентообладатель: Ленинградский межотраслевой научно-исследовательский ин-т пищевой промышленности — № 2955606/28-23; заявл. 13.06.80; опубл. 25.11.82. Бюл. № 43.
14. Рухляева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. — М: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 288 с.
15. Шарова Н.Ю. Синтез инвертазы штаммами микромицета продуцентами лимонной кислоты *Aspergillus niger* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. — 2016. — № 1(16). — С. 60–67.
16. Alegre A.C.P., Polizeli M.L.T.M., Terenzi H.F., Jorge J.A., Guimarães L.H.S. Production of thermostable invertase by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source // Brazilian Journal of Microbiology. — 2009. — Vol. 40. — P. 612–662.
17. Alves J., Jorge J., Guimarães L. Production of Invertases by anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and teleomorphic (*Emericella nidulans*) fungi under submerged fermentation using rye flour as carbon source // Advances in Microbiology. — 2013. — Vol. 3. — P. 421–429.
18. Flores-Gallegos A.C., Castillo-Reyes F., Lafuente C.B., Loyola-Licea J.C., Reyes-Valdés M.H., Aguilar C.N., Rodríguez-Herrera R. Invertase production by *Aspergillus* and *Penicillium* and sequencing of an inv gene fragment // Micología Aplicada Internacional. — 2012. — Vol. 24(1). — P. 1–10.
19. Guimarães L.H.S., Somera A.F., Terenzi H.F., Polizeli M.L.T.M., Jorge J.A. Production of b-fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose // Process Biochemistry. — 2009. — Vol. 44. — P. 237–241.
20. Haq I., Ali S., Aslam A., Qadeer M.A. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with enhanced production of b-D-fructofuranosidase // Biores. Technol. — 2008. — Vol. 99(1). — P. 7–12.
21. Haq I., Ali S. Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates // Pak. J. Bot. — 2005. — Vol. 37(3). — P. 749–759.
22. Mussatto S.I., Aguilar C.N., Rodrigues L.R., Teixeira J.A. Fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. — 2009. — Vol. 59. — P. 76–81. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.005.
23. Nadeem Habib Ullah. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of native and chemically modified invertases from *Aspergillus niger*. — Islamabad, 2011. — 176 p.
24. Nguyen Q.D., Rezessy-Szabo J.M., Bhat M.K., Hoschke A. Purification and some properties of b-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IM1303386 // Proc. Biochem. — 2005. — Vol. 40. — P. 2461–2466.
25. Ottoni C.A., Cuervo-Fernandez R., Piccoli R.M., Moreira R., Guilarte-Maresma B., Sabino da Silva E., Rodrigues M.F.A., Maiorano A.E. Media optimization for b-fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae* // Brazilian Journal of Chemical Engineering. — 2012. — Vol. 29(1). — P. 49–59.

INVERTASE ACTIVITY UNDER CULTIVATION OF PRODUCER OF CITRIC ACID – *ASPERGILLUS NIGER* STRAINS – USING MOLASSES AND HYDROLYSATES OF STARCH

N.Yu. SHAROVA, T.V. VYBORNOVA, A.I. KILEEVA, A.R. USHKAUSKAYTE

All-Russian Research Institute for Food Additives,

Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg

Producers of citric acid, strains of micromycete *Aspergillus niger* have a high capacity for synthesis of hydrolytic enzymes as additional target metabolites by submerged method of cultivation on carbohydrate-containing substrates. The article presents the results of research invertase activity during fermentation by strains of *Aspergillus niger* L-4 and B-3 molasses environment and hydrolysates of starch. Intracellular invertase activity at 120 h of biotechnological process in terms of 1 g of mycelium (10% moisture) to the fermentation molasses environment made up for the strain L-4 405 ± 10 IU/g and for strain B-3 – 398 ± 19 IU/g. During fermentation of hydrolysed starch with a dextrose equivalent, equal $12,5 \pm 0,1\%$, $38,1 \pm 0,1\%$ and $52,1 \pm 0,1\%$, invertase activity ranged from 239 ± 28 IU/g to 391 ± 31 IU/g for strain L-4 and from 271 ± 24 IU/g to 345 ± 25 IU/g for strain B-3. Invertase extracellular activity as a result of 120-hour fermentation molasses environment was $0,183 \pm 0,012$ IU/cm³ for the strain L-4, $0,194 \pm 0,011$ IU/cm³ for strain B-3. In the experiments with hydrolysed starch the value was in the range from $0,257 \pm 0,014$ IU/cm³ to $0,357 \pm 0,027$ IU/cm³ for strain L-4 and for strain B-3 it was from $0,263 \pm 0,012$ IU/cm³ to $0,297 \pm 0,027$ IU/cm³.

Keywords: *Aspergillus niger* strains L-4 and B-3, producers of citric acid, invertase activity, molasses, hydrolysates of starch.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕКТИНА МИКРОМИЦЕТА *RHIZOCTONIA SOLANI*

Рин.С. МУХАММАДИЕВ, А.Н. ИБРАГИМОВ, Т.В. БАГАЕВА*

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет

Изучены физико-химические свойства лектина низшего гриба *Rhizoctonia solani*. Установлено, что лектин гриба *R. solani* проявляет свою активность в широком диапазоне температур и рН значений ($T_{50\%}$ 5–60 °С, рН_{50%} 6,0–9,0). Наибольшая активность лектина наблюдалась при температуре 10–50 °С и рН 6,5–8,5. Повышению активности лектина *R. solani* способствует присутствие двухвалентных ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} в реакционной смеси, что свидетельствует о том, что лектин *R. solani* является металл-зависимым белком. Лектин *R. solani* обладал способностью связывать как простые, так и сложные сахара. Однако гемагглютинирующая активность препарата лектина *R. solani* ингибировалась в большей степени галактозой, что указывает на то, что лектин *R. solani* является галактозо-специфичным гликопротеидом.

Ключевые слова: *Rhizoctonia solani*, лектин, свойства.

Введение

Лектины представляют собой моно- и мультивалентные белки или гликопротеины неиммунного происхождения, обладающие свойством высокоспецифично распознавать и обратимо связывать сахара, не вызывая изменения их химической структуры [9, 15]. Они участвуют во многих биологических процессах, начиная от клеточного до органного уровня в живых организмах [2, 5]. Универсальность распространения, избирательность, активность, полифункциональность лектинов [6] отличают их от ферментов и других белков, делая их перспективными и бесценными в сфере гликоконъюгативных и биомедицинских исследований. В настоящее время лектины находят широкое применение как противоопухолевые и иммуномодулирующие препараты, в биохимии белков в качестве реагентов, для определения групп крови, в диагностике и терапии различных инфекционных заболеваний, в выявлении различных микроорганизмов [2, 12]. Кроме того, для ряда лектинов установлено противовирусное, антибактериальное, противогрибковое и инсектицидное действие.

Лектины были обнаружены, выделены и охарактеризованы в различных живых организмах, включая низшие грибы. Низшие грибы являются одной из

перспективных групп микроорганизмов, способных к активному синтезу лектинов, обладающих различными физико-химическими свойствами. Однако данных по физико-химическим свойствам лектинов низших грибов в литературе имеется незначительное количество, возможно, в связи с трудностями получения препаратов лектина в гомогенном состоянии [4].

В ранее проведенных нами исследованиях был получен лектин *Rhizoctonia solani* в гомогенном состоянии, который имел димерное строение молекулы с молекулярной массой 36 кДа [11].

Целью данного исследования было изучение физико-химических свойств лектина *Rhizoctonia solani*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали микромицету *Rhizoctonia solani*, музея культур кафедры биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанского федерального университета.

Культивирование гриба, выделение и очистку лектина из экстракта осуществляли по ранее опубликованным методам [1, 11]. В исследованиях использовали мицелий микромицета на 8-е сутки культивирования.

Гомогенность препарата лектина *Rhizoctonia solani* контролировали методом SDS-электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [10]. Активность лектина определяли с помощью реакции гемагглютинации, используя 2%-ную суспензию нативных эритроцитов 1 группы крови [14]. Эритроциты для

© 2016 г. Мухаммадиев Рин.С., Ибрагимов А.Н., Багаева Т.В.

* **Автор для переписки:**

Багаева Татьяна Вадимовна

д.б.н., профессор кафедры биохимии и биотехнологии

Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета

E-mail: tatbag@rambler.ru

реакции гемагглютинации получали по методу Луцка с соавторами [3].

Определение температурного диапазона оптимума препарата лектина изучали по гемагглютинирующей активности в 20 мМ Tris-HCl буфере при рН 7,5, инкубируя аликвоты очищенного лектина при температуре 10–90 °С в течение 20 мин. Контролем служил препарат лектина, инкубированный в Tris-HCl буфере (20 мМ, рН 7,5) при температуре 20 °С.

Для определения термостабильности препарата лектин в Tris-HCl буфере (20 мМ, рН 7,5) выдерживали в интервале температур от 10 до 90 °С в течение 1 часа. Через определенные промежутки времени образцы отбирали, охлаждали в ледяной бане до 20 °С и определяли остаточную гемагглютинирующую активность.

Диапазон рН-оптимума препарата лектина устанавливали по гемагглютинирующей активности в различных буферных растворах при значениях рН от 3,0 до 11,0. В качестве буферных растворов использовали: 20 мМ глицин-HCl буфер, рН 1,0–4,0, 20 мМ ацетатный буфер, рН 4,0–6,0, 20 мМ фосфатный буфер рН 6,0–7,0, 20 мМ Трис-HCl буфер, рН 7,0–9,0 и 20 мМ глицин-NaOH буфер, рН 9,0–11,0. Препарат лектина инкубировали в буферных растворах при температуре 20 °С в течение 1 ч. Контролем служил препарат лектина, инкубированный в Tris-HCl буфере (20 мМ, рН 7,5).

Для определения рН-стабильности раствор лектина подвергали диализу в растворе 20 мМ буфера в диапазоне значений рН от 2,0 до 11,0 в течение 24 часов при температуре 20 °С, после чего рН доводили до 7,4 и измеряли остаточную гемагглютинирующую активность.

Лектиновую активность выражали в виде процента относительной активности к контролю. Время полуинактивации препарата было выражено как время и температура, при которых сохранялась половина лектиновой активности

Влияние ионов металлов на активность лектина определяли методом реакции прямой гемагглютинации в специальных иммунологических U-образных планшетах, используя 2%-ную суспензию нативных эритроцитов человека 1 группы крови и растворов солей металлов. В качестве солей металлов использовали растворы CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₃, FeSO₄, CuSO₄, MnCl₂, KCl, CoCl₂ в концентрациях от 1 до 20 мМ. Для приготовления растворов солей металлов использовали 20 мМ Tris-HCl буферный раствор (рН 7,5). Реакционная смесь содержала 0,025 мл раствора, очищенного лек-

тина и 0,025 мл растворов солей металлов различных концентраций. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 60 минут. Затем определяли гемагглютинирующую активность лектина.

Углеводную специфичность препарата определяли методом ингибирования реакции гемагглютинации после взаимодействия лектина с различными углеводами [14]. Результаты по углеводной специфичности лектина выражали через значения МИК (минимальная ингибирующая концентрация), которая была определена как наименьшая концентрация углевода, способная к полному ингибированию гемагглютинации.

Результаты и обсуждение

Одной из важных характеристик в технологии получения и использования белковых препаратов являются показатели диапазонов их температурных и рН-оптимумов, а также свойства термо- и рН-стабильности.

Определение температурного оптимума препарата лектина показало, что активность лектина микромицета *R. solani* наблюдается в широком диапазоне температур 0–79 °С (рис. 1). Максимальная активность лектина *R. solani* находилась в области от 10 до 50 °С. При температурах 5 и 60 °С наблюдалась половина активности от максимальной, при 75 °С гемагглютинирующая активность снижалась на 90%. Прогревание лектина *R. solani* в течение 20 мин. при более высоких температурах (80 °С и выше) приводило к полной необратимой инактивации лектина.

Изучение температурной стабильности гомогенного препарата лектина гриба *R. solani* показало, что она лежит в диапазоне 5–70 °С (табл. 1). Данный диапазон стабильности лектина зависел от времени действия температуры: при 10–50 °С активность лектина сохранялась полностью в течение 60 мин., при 70 °С половина лектиновой активности снижалась через 10 мин. инкубации, через 5 мин. при действии температуры от 80 °С и выше лектин дестабилизировался, полностью теряя свою биологическую активность.

Результаты исследований по определению рН-оптимума препарата лектина продуцента продемонстрировали, что активность лектина гриба *R. solani* наблюдалась в пределах 4,0–11,0 (рис. 2). Наибольшую активность лектин проявлял при рН 6,5–8,5. Активность лектина снижалась на 50% при рН 6,0 и 9,0, а на 90% — при рН 4,5 и 10,5. Белок был полностью инактивирован при рН ниже 4,0 и выше 11,0.

Влияние температуры на лектиновую активность *Rhizoctonia solani*

	Т-оптимум ($T_{50\%}$)	Время полуинактивации, мин.						
		5 °С	10–50 °С	55 °С	60 °С	65 °С	70 °С	80 °С
Лектин	10–50 (5–60)	20	ст	40	20	15	10	нс

Примечание: $T_{50\%}$ — диапазон температурных значений, при которых гемагглютинирующая активность выше 50% от наибольшего значения; ст — белок стабилен при инкубации в течение 60 мин; нс — белок нестабилен и инактивируется за 5 мин.

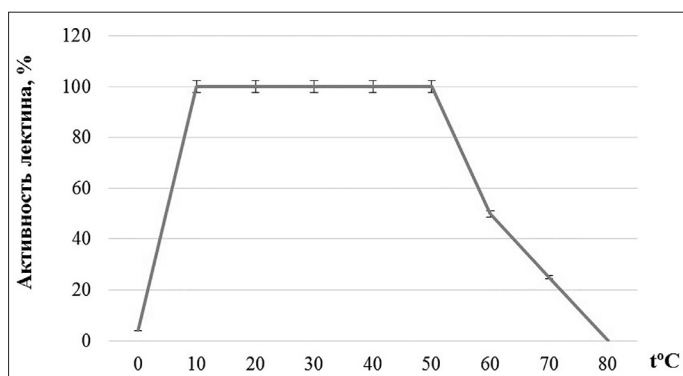


Рис. 1. Температурный оптимум лектина *Rhizoctonia solani*

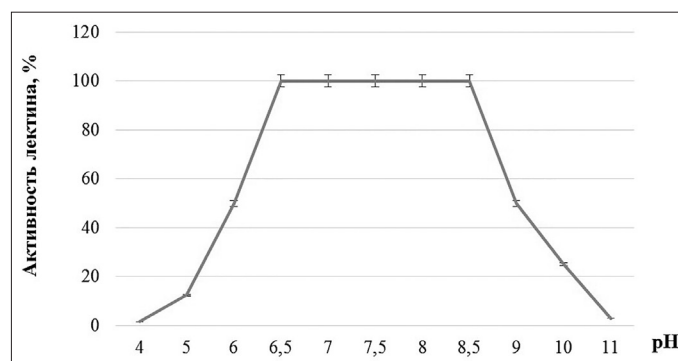


Рис. 2. pH-оптимум лектина *Rhizoctonia solani*

Изучение pH-стабильности препарата лектина гриба *R. solani* показало, что лектин сохраняет свою активность в пределах pH от 7,0 до 8,0 (табл. 2). Активность лектинов уменьшалась на 50% при pH 8,5 через 12 часов инкубации препарата, при pH 6,0 и 9,0 через 60 мин. При использовании буфера со значением pH 4,0–5,0 или 10,0–11,0 белок был нестабилен и полностью инактивировался в течение 60 мин.

Полученные данные согласуются с результатами исследований за рубежом, где установлено, что лектины из микроорганизмов обладают широкими

интервалами оптимальных значений температур и pH, при которых наблюдается их активность. Так, лектины ряда низших грибов активны в пределах температур от 5 до 100 °С и pH от 1,5 до 12,5 [7, 13]. В нашем случае полученный гомогенный препарат лектина гриба *R. solani* проявлял активность и стабильность в широком диапазоне температур (10–50 °С). Однако диапазон pH-оптимума и pH-стабильности был значительно более узкий (pH 6,5–8,5 и 7,0–8,0), что следует учитывать при получении и использовании лектина в экспериментах.

Таблица 2

Влияние pH на лектиновую активность *Rhizoctonia solani*

	pH-оптимум ($pH_{50\%}$)	Время полуинактивации, ч											
		4	5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	10	11	
Лектин	6,5–8,5 (6,0–9,0)	нс	нс	1	6	ст	ст	ст	12	1	нс	нс	

Примечание: $pH_{50\%}$ — диапазон pH-значений, при которых гемагглютинирующая активность выше 50% от наибольшего значения; ст — белок стабилен при инкубации в течение 24 часов; нс — белок нестабилен и инактивируется за 60 мин.

Активность лектинов различных организмов зависит от присутствия в их структуре ионов металлов. Значение данного свойства отражено в классификации лектинов [8].

Влияние ионов металлов на активность лектина определяли по их взаимодействию с различными металлами. В качестве солей металлов использовали растворы CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_3 , FeSO_4 , CuSO_4 , MnCl_2 , KCl , CoCl_2 в концентрациях от 1,25 до 20 мМ. Контролем служила активность лектина в стандартных условиях в отсутствие ионов металлов.

В ходе исследования выявлено, что инкубация лектина с растворами двухвалентных ионов Ca^{2+} в кон-

центрации 2,5–20 мМ и ионов Mn^{2+} в концентрации 10–20 мМ, повышала гемагглютинирующую активность лектинов в 2 раза, что свидетельствует о том, что лектин *R. solani* представляет собой металлозависимый белок (табл. 3). Можно предположить, что данные ионы металлов, по-видимому, необходимы как для организации и формирования сайта связывания углеводов лектинов, так и для обеспечения общей стабильности структуры белка. Присутствие в реакционной смеси остальных солей металлов в различных концентрациях не оказывало влияния на изменение активности лектина *R. solani*.

Таблица 3

Влияние ионов металлов на активность лектина *Rhizoctonia solani*

Соединения металлов	Активность лектина, титр				
	20 мМ	10 мМ	5 мМ	2,5 мМ	1,25 мМ
CaCl_2	8192	8192	8192	8192	4096
MgCl_2	4096	4096	4096	4096	4096
ZnCl_2	4096	4096	4096	4096	4096
AlCl_3	4096	4096	4096	4096	4096
FeCl_3	4096	4096	4096	4096	4096
FeSO_4	4096	4096	4096	4096	4096
CuSO_4	4096	4096	4096	4096	4096
MnCl_2	8192	8192	4096	4096	4096
KCl	4096	4096	4096	4096	4096
CoCl_2	4096	4096	4096	4096	4096
Контроль	4096				

Характеризуя физико-химические свойства лектина *R. solani*, надо отметить и его избирательную способность к взаимодействию с определенными углеводами, поскольку именно это свойство придает лектинам уникальность и делает их перспективными для диагностики, профилактики, лечения инфекционных заболеваний и других видов патологии.

Углеводную специфичность лектина *Rhizoctonia solani* определяли по ингибированию реакции гемагглютинации лектина *R. solani* с эритроцитами в присутствии различных углеводов в концентрациях 300 мМ для простых сахаров и 5 мг/мл — для сложных сахаров.

Тест на ингибирование реакции гемагглютинации лектина *R. solani* различными углеводами установил, что лектин *R. solani* имел сродство с простыми сахарами: D-галактозой и N-ацетилгалактозамином (при минимальной ингибирующей концентрации 0,147 и 0,586 мМ, соответственно); с дисахаридами: D-лактозой и D-мелибиозой (с МИК 0,293 мМ); с трисахаридом — D-раффинозой (с МИК 1,172 мМ), а также с полисахаридом хондроитин-6-сульфатом (МИК 1,25 мг/мл) (табл. 4). Наличие остальных углеводов в реакционной смеси не влияло на способность лектинов данного микроицета агглютинировать с эритроцитами, что свидетельствует об отсутствии специфического взаимодействия лектина *R. solani* с данными углеводами.

Таблица 4

**Ингибирование различными углеводами реакции
гемагглютинации лектина *Rhizoctonia solani*
с эритроцитами**

Ингибиторы	Препарат лектина <i>R. solani</i>
N-ацетилглюкозамин	НИ
N-ацетилгалактозамин	>0,586 мМ
D- глюкоза	НИ
D-арабиноза	НИ
L-арабиноза	НИ
D-ксилоза	НИ
D-рибоза	НИ
D-лактоза	>0,293 мМ
L-фукоза	>0,293 мМ
D-фукоза	НИ
D-галактоза	>0,147 мМ
D-маннит	НИ
D-мелибиоза	>0,293 мМ
D-фруктоза	НИ
D-раффиноза	>1,172 мМ
L-рамноза	НИ
D-мальтоза	НИ
D-сахароза	НИ
D-манноза	НИ
Целлобиоза	НИ
Декстран	НИ
Крахмал	НИ
Ксилан	НИ
Хондроитин-6-сульфат	>1,25 мг/мл

Примечание: НИ – не ингибирует

Заключение

Таким образом, результаты исследования показали, что лектин микромицета *R. solani* является термостабильным и щелочустойчивым белком. Лектин *R. solani* обнаруживают наибольшую активность при оптимуме температур в диапазоне 10–50 °С и значениях рН 6,5–8,5. Лектин *R. solani* является металл-зависимым белком, поскольку присутствие ионов металлов Ca^{2+} и Mn^{2+} в реакционной смеси повышают его гемагглютинирующую активность. Кроме того, гемагглютинирующая активность препарата лектина *R. solani* тормозится галактозой в большей

степени (минимальная ингибирующая концентрация 0,147 мМ), чем другими углеводами, указывая на то, что лектин *R. solani* является галактозо-специфичным гликопротеидом. Представленная характеристика физико-химических свойств лектина *R. solani* в значительной степени отличает его от лектинов других микромицетов, что свидетельствует о новизне полученного препарата.

Литература

1. Багаева Т.В., Мухаммадиев Рин. С., Мухаммадиев Риш. С., Алимova Ф.К. Скрининг микромицетов по способности к синтезу лектинов // Микология и фитопатология. – 2014. – Т. 48. – № 2. – С. 107–111.
2. Лоенко Ю.Н., Глазкова В.Е., Артюхов А.А. Лектины морских беспозвоночных // Успехи современной биологии. – 1992. – Т. 112. – № 5–6. – С. 785–794.
3. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. Лектины. – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
4. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Карпова И.С., Сащук Е.В., Гетьман Е.И. Внеклеточные лектины сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – № 3. – С. 256–263.
5. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Общая биология. – 2007. – Т. 68. – № 2. – С. 98–114.
6. Ямалева А.А., Осокина Т.Е. Метаболиты лекарственных растений и перспективы их использования в пищевой и фармацевтической промышленности // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 523–525.
7. Bhowal J., Mitra A., Banerjee S., Sikdar S., Guha A.K., Chatterjee B.P. Purification and characterization of an extracellular agglutinin *Trichophyton rubrum* // Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. – 2004. – Vol. 41. – No. 2–3. – P. 81–88.
8. Drikamer K. Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263. – No. 20. – P. 9557–9560.
9. Kocourek J., Horejsi V. A note of the recent discussion on definition of the term «lectin» / In: Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Bog-Hansen T.C., Spengler G.A. (Eds.). – Walter de Gruyter: Berlin, Germany, 1983. – Vol. 3. – P. 3–6.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – No. 5259. – P. 680–685.
11. Muhammadiyev R.S., Bagaeva T.V. Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani* // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – Vol. 6(6). – P. 1756–1763.

12. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology*. – 2004. – Vol. 14. – No. 11. – P. 53–62.
13. Singh R.S., Bhari R., Kaur R. Purification, characterization, and mitogenic potential of a mucin-specific mycelial lectin from *Aspergillus sparsus* // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 175. – No. 4. – P. 1938–1947.
14. Singh R.S., Tiwary A.K., Bhari R. Screening of *Aspergillus* species for occurrence of lectin activity and their characterization // *J. Basic Microbiol.* – 2008. – Vol. 48. – P. 112–117.
15. Singh R.S., Tiwary A.K., Kennedy J.F. Lectins: Sources, activities, and applications // *Crit. Rev. Biotech.* – 1999. – Vol. 19. – P. 145–178.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF LECTIN OF MICROMYCETE RHIZOCTONIA SOLANI

Rin.S. MUKHAMMADIYEV, A.N. IBRAGIMOV, T.V. BAGAYEVA

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

The physicochemical properties of lectin lower fungus *Rhizoctonia solani* were studied. It is found that the mushroom lectin *R. solani* manifests its activity over a wide range of temperatures and pH values ($T_{50\%}$ 5–60 °C, $pH_{50\%}$ 6,0–9,0). The greatest activity was observed with lectin temperature 10–50 °C and pH 6.5–8.5. The presence of divalent Ca^{+} and Mn^{2+} ions in the reaction mixture promotes increase the activity of the lectin *R. solani*, indicating that the lectin *R. solani* is a metal-dependent protein. *R. solani* lectin capable of binding both simple and complex sugars. However hemagglutinating activity of lectin preparation *R. solani* largely inhibited by galactose, indicating that *R. solani* lectin is galactose-specific glycoprotein.

Keywords: *Rhizoctonia solani*, lectin, properties.

КОНВЕРСИЯ БИОМАССЫ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В СЫРЬЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОСИНТЕЗА

В.М. ПОЖИДАЕВ*, К.В. ГОРИН, Я.Э. СЕРГЕЕВА, П.М. ГОТОВЦЕВ, Р.Г. ВАСИЛОВ

ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Работа направлена на исследование применимости электрохимического синтеза (ЭС) для переработки биомассы фототрофных микроорганизмов с целью получения биотоплив. Изучены следующие темы: получение биотоплива методом ЭС непосредственно из биомассы, исключая стадию выделения триацилглицеридов; протекание процессов ЭС в водных растворах; влияние природы растворителя; использование катализаторов и их влияние на направление процесса и выход конечных продуктов.

Ключевые слова: биотопливо, реакция Кольбе, фототрофные микроорганизмы, конверсия, электрохимический синтез.

Введение

Высокая цена неочищенной нефти и тот факт, что ископаемая нефть не является возобновляемым ресурсом, заставляет искать альтернативные источники получения продуктов нефтехимии [7]. Одним из возможных способов получения таких продуктов является путь каталитической конверсии масел природного происхождения и продуктов их переработки.

Жиры и масла являются высокоэнергетическими запасными веществами растений, животных и микроорганизмов, что делает их привлекательными для получения биотоплив. Основные компоненты натуральных масел, жиров — триацилглицериды (ТАГ) [9] реакцией переэтерификации в присутствии катализаторов превращают в сложные эфиры — биодизель (БД).

Одним из перспективных источников жиров (липидов) является биомасса фототрофных микроорганизмов, в том числе и микроводорослей, обладающих рядом полезных свойств [5].

Традиционная технология получения БД из биомассы микроорганизмов включает в себя этапы разрушения биомассы, экстракции липидов с их дальнейшей конверсией в БД [8].

Опубликован ряд статей по получению БД из нативной биомассы микроорганизмов. Так, в исследовании [15] для получения БД при одновременной экстракции и конверсии липидов влажной (90% воды) биомассы *Nannochloropsis* sp. использовали сверхкритический метанол. В работе [13] предложен двухстадийный метод получения БД: сначала биомассу *Chlorella vulgaris* гидролизуют сверхкритической водой, далее гидролизованную биомассу этерифицировали сверхкритическим этанолом. В сообщении [16] для одновременной экстракции и конверсии липидов из высушенной биомассы *Nannochloropsis* применяли СВЧ-нагрев. Авторы [11] сравнили различные способы проведения переэтерификации метанолом сухой биомассы на твердом катализаторе (SrO) в присутствии хлороформа: микроволновое излучение, ультразвук и обычный нагрев, при этом выход БД составил соответственно 37,1, 20,9 и 6,9%.

На стадии сбора биомассу микроводорослей необходимо отделить от значительного объема воды [6, 18], что сопряжено с большими энергозатратами в процессе подготовки биомассы к переработке [17]. Использование термических или механических методов извлечения (принудительная сушка, фильтр-прессование, центрифугирование) требует серьезных затрат энергии, что негативно сказывается на себестоимости конечного продукта [14]. Затраты на выделение биомассы микроводорослей могут достигать более 20–30% от общих расходов [21].

БД, получаемый из растительной биомассы, имеет ряд существенных недостатков. Низкие температуры заморозки ограничивают его широкое использование в регионах с холодными климатическими условиями. Присутствие кис-

© 2016 г. Пожидаев В.М., Горин К.В., Сергеева Я.Э., Готовцев П.М., Василов Р.Г.

* Автор для переписки:

Пожидаев Виктор Михайлович

к.х.н., главный специалист отдела биотехнологий и биоэнергетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

E-mail: pojidaev2006@yandex.ru

лорода приводит к образованию токсичных окислов азота, в сравнении с традиционным дизельным топливом [12, 19].

Декарбоксилирование жирных кислот (реакции Кольбе и нон-Кольбе) имеет более чем 150-летнюю историю и может быть использовано для конверсии растительной биомассы. Электрохимическая конверсия жирных кислот (ЖК) по реакции Кольбе с образованием димерных продуктов длиной цепи выше C_{30} описана в [9]. Электрохимическая трансформация ЖК по реакции нон-Кольбе приводит к образованию олефинов $C_{15}-C_{20}$.

На протекание процесса электрохимического синтеза влияют различные факторы (материалы электродов, растворители, рН и температура реакционной среды), в зависимости от которых электрохимическое окисление может протекать по двум основным механизмам.

В неводных растворителях роль материала электрода не столь велика, использование угольных анодов способствует механизму с участием иона карбения, а использование платины — радикальному механизму. Слабокислая среда способствует образованию продукта сочетания, в щелочной же среде проявляется тенденция к ускорению реакции, протекающей через ион карбения [3]. Реакцию окисления карбоксилатов, не связанную с образованием димерных продуктов (реакция нон-Кольбе), можно представить как превращение промежуточно образующихся радикалов и карбкатионов [10]. При этом в зависимости от условий проведения реакции могут образовываться различные классы органических соединений: парафиновые и олефиновые углеводороды, простые и сложные эфиры [1]. В работе [20] описан процесс получения БД путем омыления кокосового масла. Для подавления димеризации образующихся радикалов в электролит вводили соли уксусной кислоты [1].

Краткий анализ литературы по электрохимической конверсии масел растительного происхождения показывает, что электрохимическое декарбоксилирование жирных кислот может служить удобным методом получения альфа-олефинов, спиртов, простых и сложных эфиров.

Поскольку классические способы получения БД из растительного сырья сопровождаются необходимостью решения ряда проблем, таких как выделение биомассы из больших объемов водных растворов и ее высушивание, получение масел/липидов и отделение балластной биомассы, щелочная или кислотная переэтерификация, использование избытка спирта, многократно превышающего стехиометрические значения, регенерация непрореагировавшего спирта, утилизация большого количества (кислотных или щелочных) отходов и глицерина [4], можно предположить, что применение электрохимических методов переработки

биомассы фототрофных микроорганизмов в биотопливо будет менее проблематичным.

Целью настоящей работы было изучение возможностей электрохимического синтеза для переработки биомассы фототрофных микроорганизмов.

Основные этапы работы включали в себя исследование:

- возможности получения биотоплива методом ЭС непосредственно из биомассы, без отдельной стадии выделения липидов;
- протекания процессов ЭС в водных растворах;
- влияния природы растворителя;
- необходимости использования катализаторов, их влияния на направленность процесса ЭС и выход продуктов;
- состава продуктов, в зависимости от условий проведения ЭС.

Материалы и методы

Реактивы

Все использованные растворители и реактивы имели квалификацию «хч» (муравьиная кислота, уксусная кислота, КОН) или «для ВЭЖХ» (метанол, ацетонитрил), производитель реактивов Sigma-Aldrich. Содержание воды в водном метаноле 10%.

Культуры микроорганизмов

В качестве исходного сырья были выбрана биомасса фототрофных микроорганизмов: микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV1 из коллекции НИЦ «Курчатовский институт» и цианобактерии *Arthrospira platensis* K50006 — из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ).

Микроводоросль *C. vulgaris* выращивали на среде Basal [23], цианобактерию *A. platensis* — на среде Zarrouk [22]. Питательную среду готовили на фильтрованной воде. Выращивание проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, 1 л и в итоге 5 л при температуре 24 ± 2 °С, в условиях круглосуточной освещенности (3000 люкс); перемешивание осуществлялось за счет пропускания пузырьков атмосферного воздуха. При достижении концентрации клеток $20 \cdot 10^6$ ед./мл (конец логарифмической фазы роста) биомассу собирали, отделяли центрифугированием, высушивали при 50 °С (до влажности 10%) и использовали в дальнейших экспериментах.

Гидролиз биомассы

В стеклянный сосуд объемом 50 мл помещали 0,5 г биомассы, 25 мл растворителя, расчетное количество

гидроксида калия, муравьиной или уксусной кислот. Реакционную смесь нагревали при 105 ± 5 °С и постоянном перемешивании в течение 3 ч.

ЭС

Электрохимическая ячейка представляла собой сосуд, в котором проводили гидролиз биомассы, через боковую горловину которого с помощью уплотнения помещали два электрода. Материал анода — графит, катода — нержавеющая сталь. Расстояние между электродами 4–5 мм. Площадь анода из графита 380 мм², из платины — 240 мм². ЭС проводили при постоянном перемешивании на магнитной мешалке 500 об./мин. при плотности тока не менее 17 мА/см².

Выделение продуктов ЭС

По окончании процесса ЭС к реакционной смеси добавляли равное количество очищенной воды, 2 мл n-гексана, центрифугировали (10000 об./мин., 15 мин.), после разделения слоев, анализировали гексановый слой.

Определение качественного и количественного состава продуктов

Газохроматографическое определение МЭЖК. Анализ МЭЖК проводили методом газовой хроматографии на хроматографе фирмы Bruker модели 430 GC с пламенно-ионизационным детектором на кварцевой капиллярной колонке Select™ Biodisel for FAME длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Температурная программа колонки: начальная температура — 140 °С, выдержка в 4 минуты, повышение температуры до 240 °С со скоростью 5 °С/мин. и выдержка в изотермическом режиме в течение 4 минут при 240 °С. Температура инжектора — 250 °С. Температура детектора — 250 °С. Скорость потока газа-носителя (азота) 20 мл/мин., деление потока 1:10. Объем пробы 2 мкл. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили с использованием стандартной смеси МЭЖК SP-37 (Supelco 37 Component FAME_{Mix}).

Хромато-масс-спектрометрическое исследование продуктов ЭС. Хромато-масс-спектрометрические исследования проводили на газовом хроматографе HP 6890 с масс-спектрометрическим детектором MSD 5975 фирмы «Agilent Technologies». Условия хроматографирования: колонка капиллярная HP-5ms длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Начальная температура колонки 100 °С; программирование температуры от 100 до 280 °С со скоростью 15 °С/мин. Выдержка при конечной температуре 10 мин. Газ-носитель — гелий, 1 см³/мин., деление потока 1:10. Температура испарителя

280 °С, интерфейса детектора — 280 °С. Объем пробы — 1 мкл. Детектирование проводили в режиме сканирования по полному ионному току. Идентификацию соединений осуществляли по банку масс-спектров NIST 11 2011/ EPA/NIH и сравнением масс-спектров соединений с литературными данными.

Определение количественного выхода продуктов. Для определения выхода продуктов ЭС проводили исчерпывающее метилирование биомассы [2]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

По результатам хроматограмм исчерпывающего метилирования определяли среднюю суммарную площадь всех пиков для биомассы каждого образца ($S_{\text{бм}}$). Для каждого опыта также определяли средние суммарные площади пиков (S_x).

Количественный выход (N) определяли по формуле:

$$N = \frac{S_x}{S_{\text{бм}}} \times 100\%$$

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования была изучена возможность получения биотоплива методом ЭС напрямую из биомассы м/в, минуя стадии выделения и гидролиза ТАГ, для чего был проведен ЭС с использованием различных катализаторов и растворителей. Следует отметить, что ввиду высокой стоимости безводного спирта, была проведена серия экспериментов с использованием водного метанола. Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

При проведении ЭС:

- в водных растворах с использованием кислых и щелочных катализаторов выход продуктов не превышал 2%;
- в водном метаноле без катализаторов на обоих электродах выход продуктов ЭС составил 1–4%;
- в водном метаноле: с кислотным катализом на угольном и платиновом электродах выход составил 3–5 и 4–8%, соответственно (далее по тексту первая цифра соответствует данным, полученным на углеродном электроде, вторая — на платиновом); со щелочным катализатором выход был несколько выше — 4–8 и 8–10%;
- в безводном метаноле: с кислотным катализатором выход составил 2–5 и 4–8%, соответственно; со щелочным катализатором выходы были несколько выше — 5–8 и 9–18%.

Таблица 1

Результаты ЭС без предварительной обработки биомассы

№ п/п	Биомасса	Растворитель	Катализатор	Анод	рН	Выход, %
1	Сп ¹	Вода	КОН	С ⁴	12,6	<1
				Рt ⁵		<2
2	Хл ²	Вода	УК ³	С	5,1	<1
				Рt		<2
3	Сп	Метанол вод.	—	С	—	1–4
				Рt		1–3
4	Хл	Метанол вод.	—	С	—	1–2
				Рt		2–3
5	Сп	Метанол вод.	КОН	С	12,3	6–8
				Рt		8–10
6	Хл	Метанол вод.	КОН	С	12,2	4–6
				Рt		7–10
7	Сп	Метанол вод.	УК	С	5,4	3–5
				Рt		4–8
8	Хл	Метанол вод.	УК	С	5,3	3–4
				Рt		6–7
9	Сп	Метанол б/в	КОН	С	12,6	5–8
				Рt		14–18
10	Хл	Метанол б/в	КОН	С	12,5	5–8
				Рt		9–14
11	Сп	Метанол б/в	УК	С	5,4	2–4
				Рt		4–8
12	Хл	Метанол б/в	УК	С	5,3	2–5
				Рt		4–7

Примечание: ¹ – биомасса *Arthrospira platensis*; ² – биомасса *Chlorella vulgaris*; ³ – уксусная кислота; ⁴ – графит; ⁵ – платина

Таким образом, на начальном этапе исследований была показана возможность прямого использования биомассы в ЭС. Однако, как и в случае использования растительных масел, без предварительного гидролиза ТАГ, выходы конечных продуктов невысоки (10–18%).

Следующим этапом настоящего исследования было изучение возможности получения биотоплив методом ЭС из биомассы, подвергнутой предварительной обработке.

Полученные результаты (табл. 2) показали, что предварительный гидролиз биомассы значительно увеличивает выход продуктов ЭС.

В безводном метаноле в условиях щелочного гидролиза выход продуктов ЭС на угольном и платиновом электродах достигает 84 и 88%, соответственно; при этом образуются практически только МЭЖК.

При проведении предварительного кислого гидролиза выход продуктов по сравнению со щелочным были ниже и составили: для муравьиной кислоты 30 и

36%, соответственно, для уксусной – 47 и 54%, соответственно. Следует отметить, что при этом образуется смесь МЭЖК и различных углеводов в соотношении примерно 1:1 и доля легких (C_{10} – C_{20}) углеводов была в 3 раза выше в опытах с уксусной кислоты (91%), чем при использовании муравьиной (30%).

На следующем этапе исследований для снижения рН в реакцию смесь после щелочного гидролиза добавляли кислоту. При проведении процесса данным образом были достигнуты максимальные выходы продуктов ЭС как на угольном, так и на платиновом электроде для каждой из использованных кислот.

В среде безводного метанола в опытах с муравьиной кислотой выходы составили 51 и 54%, соответственно, в аналогичных же опытах с уксусной кислотой выходы увеличились до 85 и 90%. При этом в обоих случаях образуется смесь МЭЖК и различных углеводов в соотношении 1:1; доля легких углеводов (C_{10} – C_{20}) составляет порядка 30 и 90%, соответственно.

Результаты ЭС после предварительного гидролиза биомассы

№ п/п	Биомасса	Растворитель	Катализатор	Анод	рН	Выход, %	Состав	
							продуктов, МЭЖК (%)	углеводородов ³ , легкие (%)
							Угл. (%)	
							тяжелые (%)	
1	Сп	Метанол б/в	КОН	С	12,0	81–84	100/0	
				Pt		84–88	100/0	
2	Сп	Метанол б/в	МК ¹	С	4,5	21–30	50/50	
				Pt		30–36	50/50	
3	Сп	Метанол б/в	УК	С	5,5	41–47	50/50	
				Pt		50–54	50/50	
4	Сп	Метанол б/в	КОН+МК ²	С	5,4	36–51	50/50	
				Pt		40–54	50/50	
5	Сп	Метанол б/в	КОН+УК	С	5,6	80–85	50/50	
				Pt		85–89	50/50	
6	Хл	Метанол б/в	КОН+УК	С	5,4	71–80	50/50	
				Pt		80–87	50/50	
7	Сп	Метанол вод.	КОН	С	12,0	4–6	9/91	
				Pt		9–12	12/88	
8	Хл	Метанол вод.	КОН	С	12,0	22–25	21/79	
				Pt		27–30	20/80	
9	Сп	Метанол вод.	УК	С	4,9	10–12	15/85	
				Pt		23–27	19/81	
10	Сп	Метанол вод.	КОН+УК	С	5,9	29–39	18/82	
				Pt		41–45	19/81	

Примечание: ¹ – муравьиная кислота; ² – предварительный гидролиз с КОН, кислоту добавляли перед ЭС; ³ – углеводороды: легкие – C₁₀–C₂₀, тяжелые – C₂₁–C₃₄

При проведении предварительного щелочного или кислого гидролиза в водном метаноле образуются смеси МЭЖК и углеводов, при этом доля последних достигает 91%. Лучшие результаты были получены при использовании щелочного гидролиза с последующей добавкой УК для снижения рН реакционной смеси. В данном случае выходы целевых продуктов достигают 39 и 45%, соответственно, а доля образовавшихся легких углеводов достигает 82%.

Таким образом, при исследовании условий протекания процессов ЭС в водных растворах и растворителях изучено влияние природы растворителя и катализаторов на направление протекания процесса ЭС и выход конечных продуктов, а также показано изменение состава продуктов реакции ЭС в зависимости от условий его осуществления.

Наилучшие результаты получены при проведении процесса в безводном метаноле с предварительным щелочным гидролизом нативной биомассы, минуя стадии выделения и гидролиза ТАГ. Такой процесс практически полностью заменяет классическую технологию получения БД и имеет заметные преимущества: отсутствие

использования больших избытков спирта, значительно превышающих стехиометрические значения; снижение количеств катализатора; проведение процесса в одну стадию; уменьшение количеств отходов производства.

Нефтяное дизельное топливо имеет углеводородный состав от C₁₃ до C₁₉ (верхняя точка температуры кипения 360 °С); поэтому получение фракций углеводов, близких к дизельному топливу, представляется весьма перспективным для дальнейшего их применения.

Практически все предшествующие опыты были проведены в спиртосодержащих растворителях с целью создания гомогенной реакционной среды для оптимального контакта реагентов с поверхностью электродов. В этом случае протекают две конкурирующие реакции: этерификация жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза ТАГ биомассы соответствующим спиртов (в конкретном случае, метанолом) с образованием МЭЖК; электрохимические реакции, сопровождающиеся декарбонизацией кислот с образованием углеводов.

Для исключения протекания конкурентных реакций заменяли метанол на полярный растворитель — аце-

тонитрил, который, с одной стороны, позволил создать гомогенную реакционную среду, а с другой — исключил возможность протекания реакции этерификации. Результаты экспериментов по ЭС в среде ацетонитрила представлены в таблице 3. Следует отметить, что ис-

пользование ацетонитрила в ЭС приводит к образованию фракции различных углеводородов, без примесей кислородсодержащих соединений; при этом образуются насыщенные и ненасыщенные углеводороды нормального и изо-строения.

Таблица 3

Результаты ЭС с использованием ацетонитрила

№ п/п	Биомасса	Растворитель	Катализатор	Анод	рН	Выход, %	Состав углеводородов,	
							легкие (%)	тяжелые (%)
1	Сп	Ацетонитрил	КОН	С	12,5	11–14	40/60	
				Pt		20–27	29/71	
МК			С	4,4	13–15	24/76		
			Pt		19–30	32/68		
3			КОН+УК	С	5,4	35–41	72/28	
				Pt		51–56	76/24	

В экспериментах по предварительной обработке биомассы щелочным гидролизом выход продуктов ЭС на угольном и платиновом электродах достигает 14 и 27%, соответственно, и содержание легких углеводородов ($C_{10}-C_{20}$) в смеси достигает, в зависимости от используемого электрода, 40 и 29%. При проведении предварительного кислотного гидролиза выходы продуктов на разных электродах снижаются до 15 и 30%; при этом доля легких остается примерно на том же уровне: 24 и 32%, соответственно. Дополнительное внесение уксусной кислоты для снижения рН реакционной смеси после щелочного гидролиза приводит к увеличению выхода углеводородов на угольном и платиновом электродах до 41 и 56%, соответственно; при этом доля легких углеводородов в смеси также возрастает до 72 и 76%.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность прямой конверсии биомассы фототрофных микроорганизмов в биотопливо методом ЭС и подобраны оптимальные условия проведения процесса.

Литература

1. Андреев В.Н. и др. Электродокаталитические трансформации растительного сырья в продукты нефтехимии. Обзор // Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2013. — Т. 49. — № 1. — С. 35–43.
2. Бадранова Г.У., Борголов А.В., Василев Р.Г., Горин К.В., Готовцев П.М., Пожидаев В.М., Сергеева Я.Э. Опреде-

ление степени конверсии продуктов микробиологического синтеза в биодизель методом газовой хроматографии // Журнал аналитической химии. — 2016. — Т. 71. — № 6. — С. 653–659.

3. Органическая электрохимия: В двух книгах: Кн. 1 / под ред. М. Бейзера и Х. Лунда (пер. с англ. под ред. В.А. Петросяна и Л.Г. Феоктистова). — М.: Химия, 1988. — 469 с.
4. Пожидаев В.М., Горин К.В., Ульянова Ю.В., Савин К.А., Сергеева Я.Э., Комова А.В., Борголов А.В., Василев Р.Г. Современные технологии получения биодизельного топлива // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 3. — С. 20–39.
5. Ación Fernández F.G., González-López C.V., Fernández Sevilla J.M., Molina Grima E. Conversion of CO_2 into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO_2 removal? // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — Vol. 96. — No. 3. — P. 577–586.
6. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renew. Sust. Energy Rev. — 2010. — Vol. 14. — No. 2. — P. 557–577.
7. Concepcion J.J. et al. Chemical approaches to artificial photosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — Vol. 109. — No. 39. — P. 15560–15564.
8. de Boer K., Moheimani N.R., Borowitzka M.A., Bahri P.A. Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: A review focused on energy consumption // J. Appl. Phycol. — 2012. — Vol. 24. — No. 6. — P. 1681–1698.
9. dos Santos T.R. et al. Electrochemistry for biofuel eneration: Transformation of fatty acids and triglycerides to diesel-like olefin/ether mixtures and olefins // Chem. Sus. Chem. — 2015. — Vol. 8. — No. 5. — P. 886–893.

10. *Ebersson L.* Studies on the Kolbe electrolytic synthesis // *Acta. Chem. Scand.* – 1963. – Vol. 17. – P. 1196–1202.
11. *Koberg M. et al.* Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation // *Bioresour. Technol.* – Vol. 102. – No. 5. – P. 4265–4269.
12. *Laurent E., Delmon B.* Study of the hydrodeoxygenation of carbonyl, carboxylic and guaiacyl groups over sulfided $\text{CoMo}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ and $\text{NiMo}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts: I. Catalytic reaction schemes // *Appl. Catalysis, A.* – 1994. – Vol. 109. – No. 1. – P. 77–96.
13. *Levine R.B., Pinnarat T., Savage P.E.* Biodiesel production from wet algal biomass through in situ lipid hydrolysis and supercritical transesterification // *Energy and Fuels.* – 2010. – Vol. 24. – No. 9. – P. 5235–5243.
14. *Molina Grima E. et al.* Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics // *Biotechnol. Adv.* – 2003. – Vol. 20. – No. 7–8. – P. 491–515.
15. *Patil P. D. et al.* Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – No. 1. – P. 118–122.
16. *Patil P.D. et al.* Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – No. 2. – P. 1399–1405.
17. *Posten C., Schaub G.* Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels – a process view // *J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 142. – No. 1 – P. 64–69.
18. *Schlesinger A. et al.* Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – Vol. 30. – No. 5. – P. 1023–1030.
19. *Schmidt K., van Gerpen J.* The effect of Biodiesel fuel composition on diesel combustion and emissions // *SAE Technical Paper Series.* – 1996. – No. 961086.
20. *Sumera F.C., Sadain S.* Diesel fuel by Kolbe electrolysis of potassium of salts of coconut fatty acids and acetic acids. // *Philippine J. Sci.* – 1990. – Vol. 119. – No. 4. – P. 333–345.
21. *Surendhiran D., Vijay M.* Influence of bioflocculation parameters on harvesting *Chlorella salina* and its optimization using response surface methodology // *J. Environ. Chem. Eng.* – 2013. – Vol. 1. – No. 4. – P. 1051–1056.
22. *Xie Y. et al.* Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation // *Bioresour. Technol.* – 2015. – Vol. 180. – P. 281–287.
23. *Yeh K.-L., Chang J.-S.* Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31 // *Bioresour. Technol.* – 2012. – Vol. 105. – P. 120–127.

CONVERSION OF BIOMASS OF PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS INTO RAW MATERIALS FOR PRODUCING BIOFUELS USING ELECTROSYNTHESIS

V.M. POZHIDAEV, K.V. GORIN, Y.E. SERGEEVA, P.M. GOTOVTSEV, R.G. VASILOV

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The work aims to study the applicability of the electrochemical synthesis (ES) for the processing of biomass of phototrophic microorganisms to produce biofuels. The following topics are studied: obtaining biofuels by ES directly from biomass, eliminating the step of isolating triacylglycerols; flowing ES processes in aqueous solutions; influence of the nature of the solvent; the use of catalysts and their influence on the direction of the process and the quality of final products.

Keywords: biofuel, Kolbe reaction, phototrophic microorganisms, conversion, electrochemical synthesis.

О ДЕЙСТВИИ N,N-ДИФЕНИЛГУАНИДИНИЕВОЙ СОЛИ БИС (ГИДРОКСИМЕТИЛ) ФОСФИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ СБРОЖЕННОГО ИЛА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕПЕНЯХ РАЗБАВЛЕНИЯ

Н.В. ВОЛКОВА*, С.В. ФРИДЛАНД

Казанский национальный исследовательский технологический университет

В настоящее время в связи с масштабной урбанизацией резко повысилась нагрузка на городские очистные сооружения г. Казани, а также за счет нарастания объемов производств органического синтеза и, как следствие, увеличение отходящих потоков, встает вопрос об интенсификации биологической очистки сточных вод. Использование биологически активных веществ в ходе очистки с помощью биоценозов, приводящее к увеличению эффективности этого процесса, имеет существенные преимущества, включающие в себя минимизацию капитальных и эксплуатационных затрат. Новизна проведенной работы состоит в том, что впервые исследование воздействия рассматриваемой соли на рост микроорганизмов осуществлялось в анаэробных условиях. В связи с тем, что исследование возможности интенсификации биологической очистки сточных вод в анаэробных условиях при ограниченном времени экспозиции не показало желаемых результатов, было решено увеличить время процесса для более глубокого изучения воздействия N,N-дифенилгуанидиниевой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты на микроорганизмы сброженного ила; тем более, что временное подавление развития ряда организмов в дальнейшем приводит к взлету их активности. Были определены концентрации, увеличивающие фазу экспоненциального роста, в ходе которой и происходит максимальное потребление субстрата. Наибольший положительный эффект вышеуказанных концентраций отмечен в интервале 20÷40 часов эксперимента.

Ключевые слова: биологически активные вещества, микроорганизмы, сверхнизкие концентрации, сточные воды, биологическая очистка.

Введение

В настоящее время остро стоит вопрос интенсификации биологической очистки сточных вод. Использование синтетических биорегуляторов, способных в низких и сверхнизких концентрациях повышать скорость очистки сточных вод, значительно снижает расход биорегулятора и сводит к минимуму его воздействие на очищенную воду [1, 18], а также имеет существенные преимущества, включающие в себя минимизацию капитальных и эксплуатационных затрат.

Известны случаи использования фосфорсодержащих соединений при биологической очистке активным илом. Проведены экспериментальные исследования для выяснения механизма превращения соединений фосфора в активном иле [6]. Фосфиновые кислоты образуют

устойчивые соли с различными катионами [9]. Соли фосфиновых кислот обладают высокой активностью [17].

Ранее проведенными экспериментами выявлено отсутствие токсичности исследуемых растворов гуанибифосфа, а также то, что он не оказывает влияния на токсичность сточных вод, что могло бы привести к гибели составных частей биоценоза и, как следствие, увеличить значение ХПК [10].

Анаэробный метод является практичным, экономически выгодным в сравнении с аэробной очисткой, где существенные затраты идут на аэрацию, плюс требуется решение вопросов по утилизации большого количества избыточной биомассы и занятию огромных площадей для реализации процесса [4].

В ранее проведенных работах [12, 13] выявлено, что существенные изменения по очистке сточных вод происходят в первые 4 часа процесса (время аэрирования в заводских аэротенках — 8 часов). Однако исследование возможности интенсификации биологической очистки сточных вод в анаэробных условиях при ограниченном времени экспозиции [5] не показало желаемых результатов. Поэтому было решено увеличить время процесса

© 2016 г. Волкова Н.В., Фридланд С.В.

* Автор для переписки:

Волкова Наталья Валерьяновна
аспирант кафедры «Инженерной экологии» Казанского
национального исследовательского технологического университета
E-mail: 41em1@mail.ru

для более глубокого изучения воздействия гуанибифосфа на микроорганизмы сброженного ила, тем более, что временное подавление развития ряда организмов в дальнейшем приводит к взлету их активности. В процессе культивирования в аэробных условиях значение рН отобранных проб не изменялось и находилось в интервале 6–7, что соответствует оптимальным значениям для развития большинства представителей микробиоценоза активного ила [14]. Отмечен более интенсивный прирост биомассы активного ила в присутствии исследуемой соли по сравнению с контрольным образцом. Прирост биомассы для образца с концентрацией N,N-дифенилгуанидиновой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты, равной 10^{-8} г/л, составил 0,68 мг/см³ или 25% [7].

Известно, что многие природные и синтетические биологически активные вещества (БАВ) проявляют биоэффекты в области низких (10^{-10} – 10^{-4} моль/л) и сверхнизких (10^{-20} – 10^{-11} моль/л) концентраций [2, 3, 11]. С исследуемой солью были проведены эксперименты в анаэробных условиях в концентрациях 10^0 – 10^{-15} г/дм³, несмотря на то, что при изучении самоорганизации [7] и физико-химических свойств растворов гуанибифосфа в широком диапазоне концентраций в естественных и гипoeлектромагнитных условиях найдена пороговая концентрация 10^{-5} моль/л, свидетельствующая, что ассоциаты в растворах гуанибифосфа образуются в области концентраций 10^{-12} – 10^{-6} моль/л. Вода имеет большой дипольный момент, что способствует самоорганизации ее молекул [8], чем можно объяснить результаты ряда исследований в области низких концентраций.

Настоящая работа посвящена изучению влияния N,N-дифенилгуанидиновой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты (гуанибифосф) [15] на рост микроорганизмов сброженного ила.

Материалы и методы

Сточная вода для эксперимента, отобранная из лотка перед подачей в аэротенк городских очистных сооружений г. Казани, на вид представляла мутную жидкость серого цвета с неприятным запахом.

Активный ил для исследования влияния гуанибифосфа отбирался из аэротенка тех же очистных сооружений со стадии регенерации. Подготовка биомассы для ее использования в анаэробных условиях заключалась в сбраживании ила при температуре 25–27 °С в течение двух недель. В процессе сбраживания отмечено выделение биогаза. Биомасса вместо светло-коричневого цвета приобретала черную окраску.

Эксперимент проводился в стерильных условиях в боксе, для чего заранее была подготовлена стерильная бактериологическая посуда [16].

Для исследования роста и развития биоценоза ила использовалась жидкая питательная среда следующего состава (%): ферментативный пептон («Ромат», Россия) – 1, дистиллированная вода – 99.

Рост и развитие смешанной культуры ила наблюдали в течение 96 часов. Контроль над ростом культуры осуществляли каждые 24 часа, определяя изменение оптической плотности (OD_{590}) культуры.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов исследования роста смешанной культуры микроорганизмов показал, что культура выходит на стационарную фазу на 24-й час роста при внесении соли с концентрациями 10^0 – 10^{-3} г/дм³. В этих концентрациях гуанибифосф не оказывал существенного влияния на рост микроорганизмов. Стационарная фаза длилась до 48 часов. Наиболее высокую скорость роста показала проба при концентрации этой соли 10^{-2} г/дм³, однако к 48 часу эксперимента наблюдалась более высокая стимуляция роста при концентрации 10^{-1} г/дм³. При добавлении N,N-дифенилгуанидиновой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты в концентрации 10^{-3} г/дм³ показатели роста оказались меньше на 10%, чем при концентрации 10^{-2} г/дм³. В присутствии гуанибифосфа в концентрации 10^0 г/дм³ эффективность процесса биоочистки оказалась ниже на 43%, чем с добавлением этой соли в концентрации 10^{-2} г/дм³. Было установлено ее ингибирующее действие в концентрации 10^0 г/дм³.

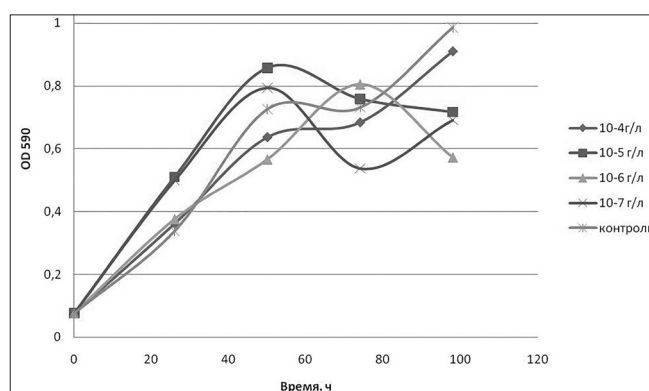


Рис. 1. Кривые роста микроорганизмов в присутствии соли в концентрации 10^{-4} – 10^{-7} г/дм³

Максимальный результат был показан для концентрации гуанибифосфа 10^{-5} г/дм³. При этой концентрации

соль стимулировала рост микроорганизмов на 18% выше относительно контрольной пробы, а для концентрации 10^{-6} г/дм³ было установлено подавление роста относительно контрольной пробы на 22%. Анализ динамики роста смешанной культуры микроорганизмов при внесении гуанибифосфа в концентрациях 10^{-4} – 10^{-7} г/дм³ и в его отсутствии показал, что культура выходит на стационарную фазу на 50-й час роста.

В пределах рассматриваемых концентраций идет различное влияние соли на разных стадиях роста. Гуанибифосф в концентрациях 10^{-8} , 10^{-10} и 10^{-11} г/дм³ на 24-й час роста продемонстрировал лучшие результаты в сравнении с контролем. Пробы с концентрациями 10^{-9} и 10^{-12} г/дм³ к 48-му часу роста установили лучший стимулирующий эффект в сравнении с контролем на 52 и 38%, соответственно, а концентрация 10^{-13} г/дм³ на 48-й час роста оказалась менее эффективна, чем контроль, на 48%. Как видно из данных эксперимента, представленных на рисунке 2, максимальный результат показан при внесении соли со степенью разбавления, соответствующей концентрации 10^{-9} г/дм³. Эта концентрация оказалась эффективнее контрольной пробы на 52%, а образец с концентрацией гуанибифосфа 10^{-13} г/дм³ дал наихудший результат и оказался ниже контрольной пробы на 48%.

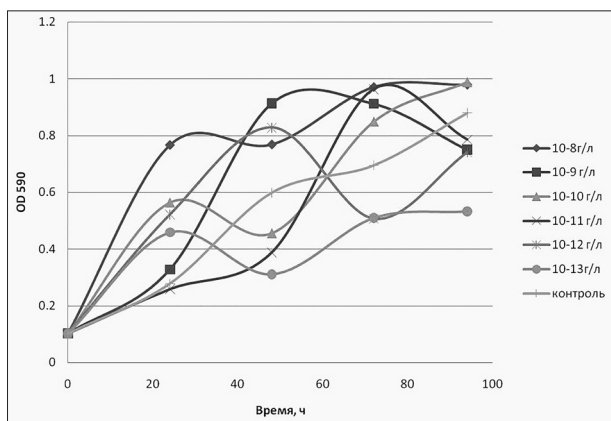


Рис. 2. Кривые роста микроорганизмов в присутствии соли в концентрации 10^{-8} – 10^{-13} г/дм³

Рассмотрев результаты эксперимента, представленные в виде кривых роста смешанной культуры микроорганизмов, при внесении гуанибифосфа с концентрацией 10^{-15} г/дм³, можно сделать вывод, что культура выходит на стационарную фазу на 48-й час роста. Эта фаза длилась до 72 часа. При внесении соли в концентрации 10^{-14} г/дм³ и в его отсутствие анализ динамики роста смешанной культуры микроорганизмов выявил, что культура выходит на стационарную фазу на 24-й час роста. Стационарная фаза длилась до 72 часа. Про-

ба с концентрацией гуанибифосфа 10^{-15} г/дм³ оказалась лучше контрольной пробы на 33%. Для концентрации 10^{-15} г/дм³ была отмечена стимуляция роста к 48 часу.

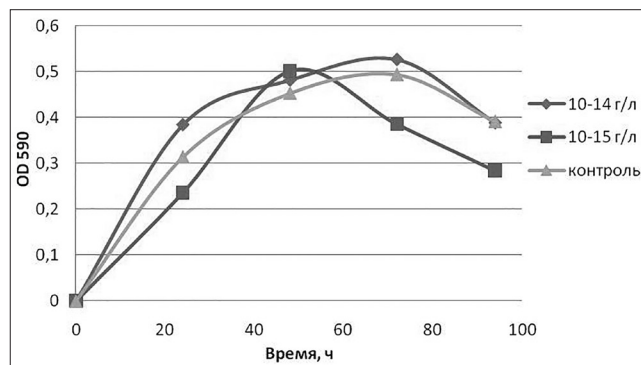


Рис. 3. Кривые роста микроорганизмов в присутствии соли в концентрации 10^{-14} – 10^{-15} г/дм³

Заключение

На основании проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. N,N-дифенилгуанидиновая соль бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты в концентрациях 10^{-4} – 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} г/дм³ увеличивает фазу экспоненциального роста, в ходе которой и происходит максимальное потребление субстрата.
2. Положительный эффект вышеуказанных концентраций отмечен в интервале 20–40 часов эксперимента.
3. Исследуемая соль в рассмотренных концентрациях оказывала различное влияние на рост смешанной культуры микроорганизмов и в концентрациях 10^0 – 10^{-3} г/дм³ вызывала ингибирующее действие.

Литература

1. Булатов В.В., Хохоев Т.Х., Дикий В.В. Проблемы малых и сверхмалых доз в токсикологии // Рос. хим. журнал. — 2002. — Т. 46. — № 6. — С. 58–62.
2. Бурлакова Е.Б. Фосфинатные соединения, проявляющие биологическую активность // Ж. Рос. хим. общества им. Д. И. Менделеева. — 1999. — Т. 43. — № 5. — С. 3–11.
3. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). — 2007. — Т. 51. — № 1. — С. 3–12.
4. Возная Н.Ф. Химия воды и микробиология. — М.: Высшая школа, 1979.
5. Волкова Н.В., Павлова Т.П., Шулаев М.В., Фридланд С.В. Сравнение влияния N,N-дифенилгуанидиниевой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты на про-

- цесс биологической очистки сточных вод в аэробных и анаэробных условиях // Вестник КТУ. — 2015. — Т. 18. — № 20. — С. 242–246.
6. Крючихин Е.М., Николаев А.Н., Большаков Н.Ю. Биочистка сточных вод от азота и фосфора // Экология и промышленность России. — 2002. — № 7. — С. 9–12.
 7. МасагUTOва Э.М. Очистка сточных вод в условиях интенсифицирующей добавки N,N-дифенилгуанидиневой соли дигидроксиметилфосфиновой кислоты под влиянием физических и химических факторов: дис. ... канд. хим. наук. — Казань, 2013. — 123 с.
 8. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Юркевич А.М., Швец В.И. Исследование биосинтеза аминокислот факультативным метилотрофом *Brevibacterium methylicum* на средах, содержащих тяжелую воду // Биотехнология. — 1996. — № 3. — С. 3–12.
 9. Нифантьев Э.Е. Химия фосфорорганических соединений. — М.: Ленинские горы, 1970. — 260 с.
 10. Павлова Т.П., Сироткин А.С., Трахунова И.А., Фридланд С.В. Стимулирующее влияние соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты и N,N-дифенилгуанидина на биоценоз активного ила // Экология и промышленность России. — 2010. — № 12. — С. 24–26.
 11. Пальмина Н.П. и др. О механизмах действия биологически активных веществ в сверхнизких концентрациях / В кн.: Состояние воды в биологических и модельных системах. — Тверь, 2007. — С. 151–158.
 12. Пантюкова М.Е., Мазлова С.В., Павлова Т.П., Шулаев М.В., Фридланд С.В. Интенсификация биологической очистки сточных вод стимуляторами процесса // Безопасность жизнедеятельности. — 2011. — № 3. — С. 31–34.
 13. Пантюкова М.Е., Павлова Т.П., Фридланд С.В. Интенсификация биологической очистки сточных вод солями бисоксиметилфосфиновой кислоты // Журнал прикладной химии. — 2010. — Т. 83. — Вып. 12. — С. 2070–2071.
 14. Пантюкова М.Е. Стимулирование биоценоза активного ила солями фосфиновой и фосфиновой кислот в процессе биологической очистки сточных вод: дис. ... канд. хим. наук. — Казань, 2011. — С. 96.
 15. Пат. 2404964 РФ, МПК С07С279/18, С02F101/30, С02F3/34. N,N-дифенилгуанидиновая соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты в качестве биостимулятора активного ила для очистки сточных вод и способ ее получения / Фридланд С.В., Павлова Т.П., Пантюкова М.Е.; № 2009125242/04; заявл. 1.07.2009; опубл. 27.11.2010. — 5 с.
 16. Шайхиев И.Г., Фридланд С.В., Степанова С.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии: учебное пособие. — Казань: КГТУ, 2007. — 100 с.
 17. Яковлева Г.М., Тарусова Н.Б., Викторова Л.С. Биологически активные фосфорорганические соединения. IX. Участие фосфинатного аналога пептидилдениловой кислоты в донорной реакции рибосом // Биоорганическая химия. — 1981. — Т. 7. — № 2. — С. 248–255.
 18. Mattson M.P., Calabrese E.J. Hormesis: a revolution in biology, toxicology and medicine. — New York: Humana Press, 2009. — P. 153–175.

ACTION OF N,N-DIPHENYLGUANIDINE SALT BIS (HYDROXYMETHYL) PHOSPHINIC ACID ON THE GROWTH OF MICROORGANISMS OF DIGESTED SLUDGE AT VARIOUS DEGREES OF DILUTION

N.V. VOLKOVA, S.V. FRIDLAND

Kazan State Technological University

Currently, due to the large-scale urbanization dramatically increased the load on the municipal wastewater treatment plant in Kazan, as well as due to the growth of volumes of production of organic synthesis and as a consequence, an increase in the waste streams, there is a question about the intensification of biological wastewater treatment. Use of biologically active substances in the course of purification by biocenosis, leading to increased efficiency of the process, has significant advantages, including minimizing capital and operating costs. The novelty of this work lies in the fact that the first study of the effect of salt on the considered microbial growth was carried out under anaerobic conditions. Due to the fact that the study of possible intensification of biological purification of sewage in anaerobic conditions, with limited exposure time showed no desired results, it was decided to increase the process time for a better understanding of the impact of N,N-diphenylguanidine salt bis (hydroxymethyl) phosphinic acid bacteria fermented sludge; moreover, that the temporary suppression of the development of a number of organisms in the future leads to the takeoff of their activity. The concentrations were determined which increase exponential growth phase, during which occurs a maximal consumption of the substrate. The greatest beneficial effect is marked in the above-mentioned concentration range 20÷40 hours of the experiment.

Keywords: biologically active substances, microorganisms, ultra-low concentrations, wastewater, biological treatment.

ПРОМОТОРЫ МУТАНТНОГО ШТАММА БАКТЕРИОФАГА Т7 ДЕМОНСТРИРУЮТ ПРИСПОСОБЛЕНИЕ К РНК-ПОЛИМЕРАЗЕ ФАГА Т3 ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ СВОИХ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

А.А. ОСИПОВ^{1,2*}, С.Г. КАМЗОЛОВА¹

¹ *Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.;*

² *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва*

Проведен анализ возможных механизмов адаптации распознавания РНК-полимеразой Т3 бактериофага неспецифических для нее поздних промоторов ДНК бактериофага Т7. В работе использован пример выживаемости мутантного штамма Т7 фага, не содержащего в своем геноме гена РНК-полимеразы и приспособившегося к росту в штамме *E. coli*, содержащего экспрессируемый ген РНК-полимеразы Т3 фага. Выживаемость мутантного штамма Т7 фага в этих условиях обусловлена приспособительными мутациями в поздних промоторах Т7. Осуществлен анализ нуклеотидных последовательностей и электростатических профилей мутантных промоторов. Показано, что адаптация поздних промоторов генома Т7 бактериофага к Т3 РНК-полимеразе связана с изменением их электростатических свойств.

Ключевые слова: промотор, электростатический потенциал, РНК-полимераза, бактериофаги Т7, Т3, узнавание.

Введение

ДНК является одним из наиболее сильно отрицательно заряженных биополимеров с гетерогенным распределением потенциала на поверхности. Белки также относятся к заряженным полимерам, электростатические профили которых отличаются неоднородностью в распределении потенциала, причем, характерно, что в случае ДНК-связывающих белков участки, вовлеченные во взаимодействие с ДНК, являются положительно заряженными [8, 17]. Эти специфические особенности электростатических характеристик двух взаимодействующих между собой биомолекул определяют один из основных механизмов, участвующих в ДНК-белковом узнавании [5, 10]. Механизм предполагает наличие характеристических электростатических поверхностей ДНК-связывающего центра белка и участка-мишени ДНК, комплементарное взаимодействие между которыми определяет ДНК-связывающую специфичность. Наибольший вклад электростатические взаимодействия вносят на начальном этапе ДНК-белкового распознавания при первичном

связывании белка с ДНК, когда белковая молекула адаптирует свою ориентацию для наилучшего пространственного соответствия в отношении участка-мишени ДНК, что важно для рационального выполнения последующих стадий, ведущих в конечном итоге к образованию продуктивного ДНК-белкового комплекса.

Разработка простого метода расчета распределения электростатического потенциала для протяженных нуклеотидных последовательностей ДНК практически любой длины [10, 14] позволило проводить исследования по выяснению роли электростатических сил в реализации функциональной активности ДНК, осуществляемой самими разными ДНК-белковыми парами, на примере целого прокариотического генома [1, 11]. Сопоставление электростатической и генетической карт ДНК полного генома бактериофага лямбда выявило соответствие локализации функционально значимых участков ДНК (промоторов, терминаторов, операторов, сайта интеграции) и присутствие характеристических неоднородностей в электростатическом профиле генома в этих местах [1].

Глобальное распределение потенциала вдоль генома фага лямбда наглядно отражает архитектуру регуляции его транскрипции и интеграции с бактерией-хозяином.

Нужно отметить две главных особенности электростатических характеристик функциональных участков генома лямбда-фага. Во-первых, все они расположены в областях ДНК с более высоким отрицательным значением потенциала по сравнению с остальной частью генома [1]. Это подтверждается данными, полученными для функцио-

© 2016 г. Осипов А.А., Камзолова С.Г.

* **Автор для переписки:**

Осипов Александр Александрович

к.б.н., ст.н.с.,

Институт биофизики клетки РАН,

Институт высшей нервной деятельности

и нейрофизиологии РАН

E-mail: aosypov@gmail.com

нальных сайтов других геномов. В частности, показано, что в процессе эволюции в промоторах *E. coli* отобраны более электроотрицательные гексануклеотиды по сравнению с кодирующими областями геномной ДНК [15].

Другой отличительной особенностью электростатических паттернов функционально значимых участков ДНК разных прокариотических геномов является наличие в них специфических элементов, характерных для каждого из них [1, 8, 10, 12, 16]. Наиболее детально такие специфические электростатические элементы были охарактеризованы у рибосомальных промоторов *E. coli* [16], а также у промоторов фагов Т4 [10], Т7 [8] и лямбда [1]. В ряде случаев была найдена корреляция между типом электростатических элементов и характером функционального поведения промоторов. Так, сила промоторов лямбда фага коррелирует с величиной отрицательного электростатического потенциала *cr*-элемента, расположенного в дальней *upstream* области промоторной ДНК (-60...-90 п.о.) [1]. Аналогичные функционально значимые электростатические *cr*-элементы обнаружены у ранних промоторов фага Т4 [10]. Показано, что эти элементы могут выступать в роли новых промоторных детерминант, внося свой вклад в промоторно-полимеразное узнавание через электростатические взаимодействия с альфа-субъединицей РНК-полимеразы [9, 10, 16]. Установлено, что характер этих взаимодействий определяет функциональное поведение ранних промоторов Т4 и контролируемых ими генов в ответ на физиологический сигнал, связанное с регулированием альфа-субъединицы РНК-полимеразы [10].

В случае tandemных рибосомальных промоторов *E. coli* присутствие в разных промоторах различных характеристических электростатических элементов обеспечивает оптимальное функционирование контролируемого ими гена в разных условиях [6]. Аналогично различия в характеристических электростатических паттернах дублирующих ранних промоторов Т7 ДНК способствует надежности узнавания промоторной зоны РНК-полимеразой в разных условиях и обеспечивает оптимизацию экспрессии соответствующего гена в зависимости от условий среды [7].

Таким образом, электростатические свойства ДНК важны для реализации ее функциональной активности. Особенности этой характеристики ДНК необходимо учитывать при исследовании механизмов взаимодействия новых ДНК-белковых пар и при анализе многочисленных примеров разнообразного проявления биологической активности геномной ДНК.

В настоящей работе изучен пример утилизации поздних промоторов мутантного генома Т7 бактерио-

фага, содержащего делецию гена собственной РНК-полимеразы и приспособившегося к росту на штамме *E. coli*, содержащем ген РНК-полимеразы фага Т3 [4].

Материалы и методы

Сведения о физиологии мутантного штамма бактериофага Т7, нуклеотидные последовательности мутаций и их биохимические характеристики взяты из [4]. Распределение электростатического потенциала вокруг двойной спирали ДНК промоторов бактериофагов Т7 и Т3 взяты из БД DEPPDB [12, 13], распределение электростатического потенциала вокруг промоторов мутантного штамма рассчитывалось с помощью инструментария БД DEPPDB в соответствии с оригинальной методикой [14].

Результаты и обсуждение

Для выявления электростатических элементов, потенциально могущих иметь значение для функционирования промоторов, распознаваемых фаговыми РНК-полимеразами, был выбран мутантный штамм бактериофага Т7, приспособившийся к росту на РНК-полимеразе родственного бактериофага Т3 [4].

Как известно, РНК-полимеразы этих фагов высокоспецифичны и крайне слабо взаимодействуют с промоторами друг друга [2, 3], тем не менее, рост фага Т7 с делецией гена РНК-полимеразы возможен в клетках *E. coli*, экспрессирующих РНК-полимеразу фага Т3. В эксперименте с такой системой было показано [4], что при исключении возможности приспособительных мутаций в гене РНК-полимеразы происходит постепенное восстановление жизнеспособности (рис. 1) мутантного фага за счет накопления мутаций в промоторных регионах.

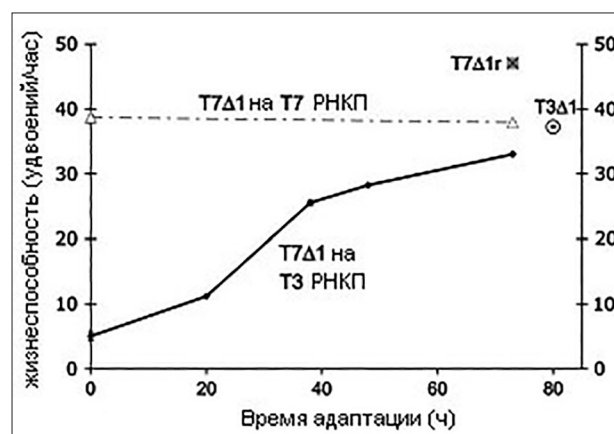
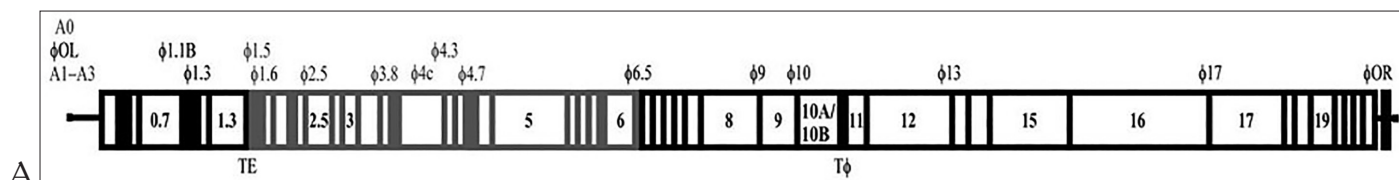


Рис. 1. Восстановление жизнеспособности мутантного фага во время эксперимента (из [4] с изменениями)

Авторами была произведена делеция области 3343-5878 генома бактериофага Т7, включающая в себя ген РНК-полимеразы и ранний промотор $\phi 1.1A$ (рис. 2а). В ходе приспособления к росту на РНК-полимеразе бактериофага Т3 у мутантного штамма бактериофага Т7 произошли следующие дополнительные мутации (рис. 2б), затрагивающие промоторные области (следует обратить внимание на *необязательный* переход к консенсусному промотору бактериофага Т3):

1. Промотор репликации (ϕOL) — в позиции 394 А → С и делеция Т в позиции 403 (обе — к консенсусу Т3).
2. Промотор класса II $\phi 1.5$ — в позиции 7768 А → С (к консенсусу Т3).
3. Промотор класса II $\phi 1.6$ — в позиции 7884 G → А (не к консенсусу Т3).
4. Промотор класса II $\phi 2.5$ — в позиции 9105 Т → А (к консенсусу Т3).
5. Промотор класса III $\phi 6.5$ — в позиции 18534 G → А (не к консенсусу Т3) и в позиции 18543 Т → А (к консенсусу Т3).
6. Промотор класса III $\phi 9$ — в позиции 21863 Т → А (к консенсусу Т3).
7. Промотор класса III $\phi 10$ — в позиции 22893 G → А (не к консенсусу Т3) и в позиции 22902 Т → А (к консенсусу Т3).
8. Промотор класса III $\phi 13$ — в позиции 27265 С → Т (*от* консенсуса Т3).
9. Промотор репликации (ϕOR) — в позиции 39218 G → А (не к консенсусу Т3) и в позиции 39227 Т → А (к консенсусу Т3).



Элемент	Функция	Мутация
ϕOL	промотор репликации	ins #1 340 394 А → С del 403 Т
0.6B	незначимая	1878 А → G Q81Q
1 ^b	РНК полимеразы	del 3343-5878
$\phi 1.5$	промотор класса II	7768 А → С
$\phi 1.6$	промотор класса II	7884 G → А
1.7	незначимая	8335 А → С N57T
$\phi 2.5$	промотор класса II	9105 Т → А
2.5	1 ⁿ ДНК-связывающий белок	9529 А → С H124P
3.5	лизозим	10736 Т → С S11P
5	ДНК полимеразы	14811 А → С E153D
$\phi 6.5$	промотор класса III	18534 G → А 18543 Т → А
7.3	инициация инфекции	19632 G → А G33D
8	соединитель головки и хвоста	21749 G → А G504S
$\phi 9$	промотор класса III	21863 Т → А
$\phi 10$	промотор класса III	22893 G → А 22902 Т → А
10B*	малый капсидный белок	24088 G → А E375K*
T ϕ *	терминатор фаговой РНАП	ins 24200 G*
12*	белок хвоста	26586 С → Т A582V*
$\phi 13$	промотор класса III	27265 С → Т
13*	внутренний белок головки	27706 А → С P134L*
14*	внутренний коровый белок	27782 G → А G19S*
16*	внутренний коровый белок	33068 А → С K825T* 34042 Т → С F1150L*
17.5*	холин	36414 Т → С V24A*
19	терминаза	37715 С → Т P116S
IG19.5		38793 А → G
ϕOR	промотор репликации	39218 G → А 39227 Т → А

Рис. 2. Мутации исследуемого штамма бактериофага Т7: А) диаграмма генома; Б) список мутаций. Позиции нуклеотидов указаны для дикого штамма Т7. Звездочками помечены мутации, не строго компенсаторные для взаимодействия с РНКП Т3. Также указана начальная делеция гена 1 (РНК-полимеразы). Вставка ins #1 после позиции 340 составляет АСТАСАТАААГАССAGАССТАААГАС (из [4] с изменениями)

Таким образом, в промоторных областях возникло 13 мутаций (рис. 3, 4), только 7 из которых являются переходом к консенсусному промотору бактериофага Т3, а одна из оставшихся 6 — переходом от консенсусного к неконсенсусному.

При этом в известной своей консервативности и считающейся важной для различения промоторов полимеразы Т3 и Т7 позиции -11 от точки старта только одна из 6 мутаций была в сторону консенсуса Т3.



Рис. 3. Логотип промоторов дикого типа бактериофагов Т7 и Т3. Величина букв пропорциональна частоте встречаемости данного нуклеотида в обозначенной позиции. Под ним указано количество мутаций в этой позиции, в верхней строке — общее, в нижней — к консенсусу Т3 (из [4] с изменениями)

Группа	Последовательность		Точка старта		Позиция	Название	Класс		
	-20	-10	+1	+10					
Т7	2	tattaataca	actcacta	Aggagagaca	acttaagag	405	phiOL	early	
	4	tattaataacc	actcactaaa	Ggagagacaa	cttaagaga	431			
	3	aatcaatacy	actcactata	Gggggacaaa	ctcaaggcca	5848	phi1.1A	early	
	3	ggttaatacy	actcactata	Ggagaacctt	aaggtttaac	5923	phi1.1B	early	
	5	ggttaatacy	actcactata	Ggagaacctt	aaggtttaac	3412			
	3	aagtaatacy	actcagtata	Gggacaatgc	ttaaggctgc	6409	phi1.3	early	
	6	aagtaatacy	actcagtata	Gggacaatgc	ttaaggctgc	3898			
	2	tggttaatacy	actcactaaa	Ggaggtacac	accatgatgt	7778	phi1.5	class II	
	4	tggttaatacy	cctcactaaa	Ggaggtacac	accatgatgt	5267			
	2	gcttaatacdg	actcactaaa	Ggagacacta	tatgtttcga	7895	phi1.6	class II	
	4	gcttaataaca	actcactaaa	Ggagacacta	tatgtttcga	5384			
	2	aagtaatacy	actcacta	Aggggaagact	ccctctgaga	9107	phi2.5	class II	
	4	aagtaatacy	actcactaat	Aggggaagact	ccctctgaga	6596			
	3	aattaattga	actcactaaa	Gggagaccac	agcggtttcc	11180	phi3.8	class II	
	5	aattaattga	actcactaaa	Gggagaccac	agcggtttcc	8669			
	3	agacaatccg	actcactaaa	Gagagagatt	attgagaacg	12671	phi4c	class II	
	5	agacaatccg	actcactaaa	Gagagagatt	attgagaacg	10160			
	3	ttctaatacy	actcactaaa	Ggagacacac	catgttcaaa	13341	phi4.3	class II	
	5	ttctaatacy	actcactaaa	Ggagacacac	catgttcaaa	10830			
	3	atactattcg	actcactata	Ggagatatta	ccatgcgtga	13915	phi4.7	class II	
5	atactattcg	actcactata	Ggagatatta	ccatgcgtga	11404				
2	aattaatacdg	actcacta	Gggagatagg	ggcctttacg	18545	phi6.5	class III		
4	aattaataca	actcactaaa	Gggagatagg	ggcctttacg	16034				
2	atttaatacy	actcacta	Gggagacctc	atctttgaaa	21865	phi9	class III		
4	atttaatacy	actcactaaa	Gggagacctc	atctttgaaa	19354				
2	aattaatacdg	actcacta	Gggagaccac	aacggtttcc	22904	phi10	class III		
4	aattaataca	actcactaaa	Gggagaccac	aacggtttcc	20393				
2	aattaatacy	actcactata	Gggagaacaa	tacgactacy	27274	phi13	class III		
4	aattaatacy	attcactata	Gggagaacaa	tacgactacy	24764				
3	aaataatacy	actcactata	Gggagaggcg	aaataatctt	34566	phi17	class III		
5	aaataatacy	actcactata	Gggagaggcg	aaataatctt	32056				
2	aattaatacdg	actcacta	Gggagaggag	ggacgaaaag	39229	phiOR	class III		
4	aattaataca	actcactaaa	Gggagaggag	ggacgaaaag	36719				
Т3	1	gtctatattac	cctcactaaa	Gggaataaag	tgatactta	383	phiOL		
	1	tagcattaac	cctcactaac	Gggagactac	ttaaggtctc	5659	phi1.05		
	1	tacagttaac	cctcactaac	Gggagagtta	aacttaaggt	6001	phi1.1		
	1	aagtaataac	cctcactaac	Aggagaatcc	ttaaggtcac	6515	phi1.3		
	1	gggcattaac	cctcactaac	Aggagacaca	caacctgtgg	7700	phi1.5		
	1	gcctaattac	cctcactaaa	Gggaacaacc	caacctatca	8851	phi2.5		
	1	agtaattaac	actcactaaa	Gggagactta	acgtttccct	10620	phi3.8		
	1	actaattaac	cctcactaac	Gggaacaacc	tcaaaccata	12435	phi4.3		
	1	tacaattaac	cctcactaaa	Gggaagaggg	agcctttatg	17177	phi6.5		
	1	acctaattac	cctcactaaa	Gggagacctc	atctttgaaa	19715	phi9		
	1	tctaattaac	cctcactaaa	Gggagagacc	atagatgcct	20750	phi10		
	1	ttgctttaac	cctcactaac	Aggaggtaac	atcatgctct	22412	phi11		
	1	gtgaattaac	cctcactaaa	Gggagacact	aatagatacy	25474	phi13		
	1	ttgcattaac	cctcactaaa	Gggagagagg	ggacttaaac	37449	phiOR		

Рис. 4. Последовательности промоторов бактериофага Т7 и его мутанта (попарно), и бактериофага Т3. Прямоугольниками выделены мутации, черными — к консенсусу Т3

Отдельно следует отметить, что полученный мутант хорошо рос на нативной полимеразе T7.

Появившиеся в ходе эксперимента мутации в промоторах T7 не могут быть полностью объяснены переходом к консенсусному по тексту последовательно-

сти промотору для РНК-полимеразы T3. Поэтому мы провели анализ свойств электростатического потенциала вокруг промоторов бактериофага T3, бактериофага T7 и его мутанта, полученного в ходе эксперимента. Результаты анализа отображены на рисунке 5.

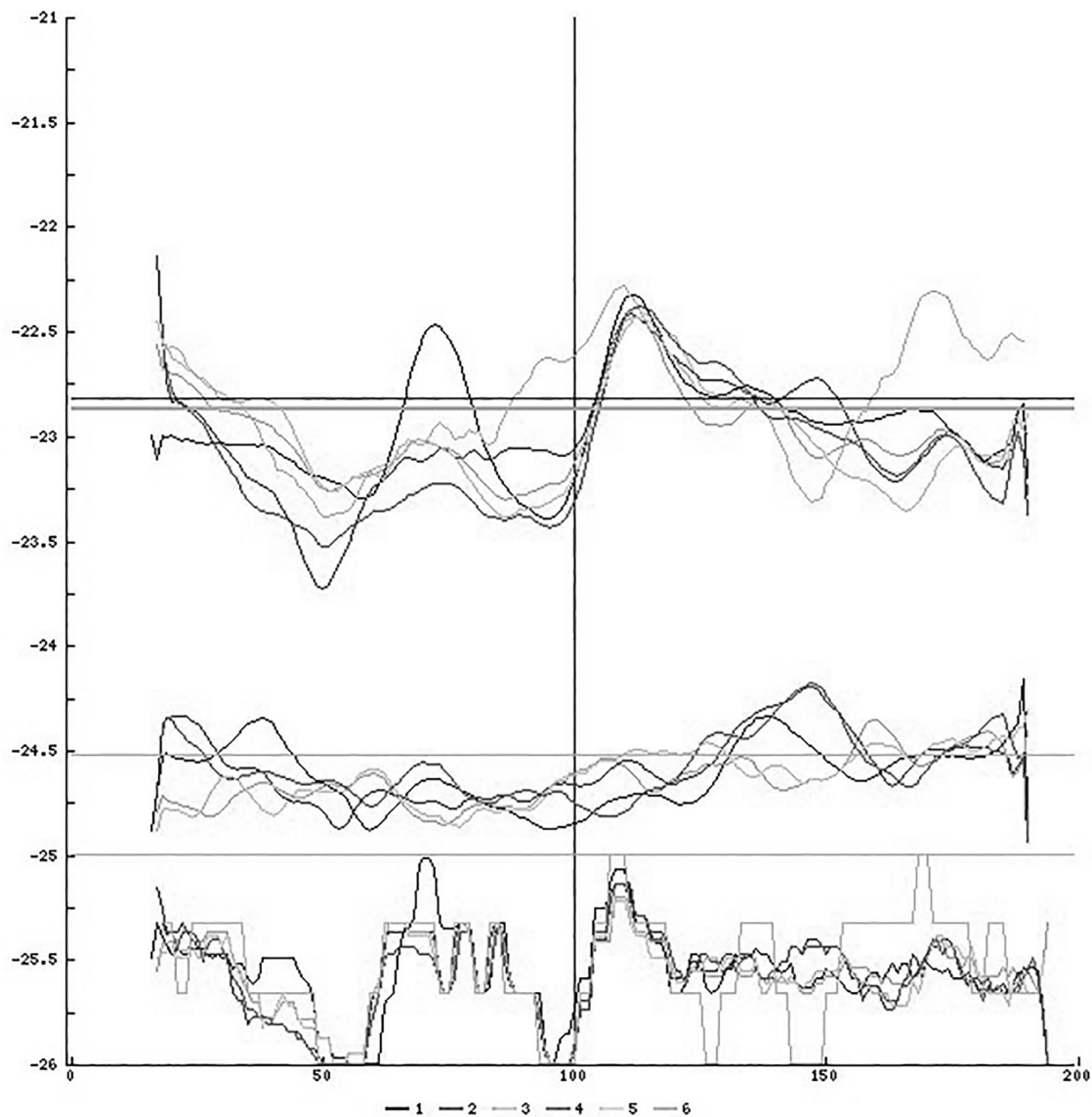


Рис. 5. Графики электростатического потенциала вокруг промоторов бактериофага T7 и его мутанта и бактериофага T3, усредненные по следующим группам:

1. Промоторы бактериофага T3 (14 шт.).
2. Промоторы бактериофага T7, мутировавшие в ходе эксперимента (9 шт.).
3. Промоторы бактериофага T7, не мутировавшие в ходе эксперимента (7 шт.).
4. Промоторы мутанта T7, мутировавшие в ходе эксперимента (9 шт.).
5. Промоторы мутанта T7, не мутировавшие в ходе эксперимента (кроме ϕ i1.3) (6 шт.).
6. Промотор ϕ i1.3 мутанта T7.

По вертикали: Верхняя часть графика — электростатический потенциал, $\sim \bar{e}/\text{Å}$, горизонтальные линии — среднее значение потенциала всего генома исследованных фагов. Средняя часть графика — стандартные отклонения для каждой группы, горизонтальные линии — среднее значение для каждого генома исследованных фагов. Нижняя часть графика — содержание GC пар в процентах для каждой группы, усреднение в окне по 3 пары вокруг каждой точки. *По горизонтали:* Расстояние вдоль последовательности 50 п.о. вокруг точки старта (+1, вертикальная линия), в ангстремах. Цвет каждого графика соответствует своей группе (см. пояснения в тексте)

Основные отличия электростатических профилей промоторов бактериофага Т7, с одной стороны, и промоторов бактериофага Т3, а также мутантного штамма Т7, с другой, находятся в области точки старта. На графике (рис. 5) хорошо видно, что в районе $-5\dots-15$ ангстрем от точки старта, что соответствует примерно $-2\dots-5$ парам оснований, электростатический потенциал промоторов бактериофага Т7 значительно выше, чем у Т3 и мутантного штамма.

Мутировавшая группа промоторов (рис. 5, линия 2) обнаруживает наибольшее отклонение потенциала, вне зависимости от позиции мутации. Показательно, что промоторы, не подвергшиеся мутациям, изначально (рис. 5, линия 3) демонстрировали профиль, близкий к профилю Т3; однако они также изменили профиль в сторону соответствия Т3, хотя и весьма незначительно (рис. 5, линия 5), несмотря на отсутствие мутаций в самих этих промоторах, что показывает влияние на электростатические свойства последовательности ее окружения.

Особняком стоит немутировавший ранний промотор $\rho h i 1.3$ (рис. 5, линия 6). Картина его электростатического профиля изменяется в сторону от общей, что приводит к ухудшению показателей соответствующей группы. Однако следует отметить, что его роль в жизнедеятельности фага, по-видимому, незначительна, так как он расположен в самом конце ранней области генома Т7, как известно, находящейся под контролем сильных промоторов бактериальной РНК-полимеразы и считывающейся ею в составе одного транскрипта, что допускает возможность выделения его в отдельную группу.

Принимая во внимание интегральный показатель активности промоторов мутировавшего штамма, выраженный не в их силе непосредственно, а в общем влиянии на жизнеспособность, можно, тем не менее, сделать вывод, что дифференциальное распознавание промоторов РНК-полимеразой бактериофага Т3, возможно, зависит от характеристик электростатического потенциала в районе $-5\dots-15$ ангстрем от точки старта, что соответствует примерно $-2\dots-5$ парам оснований. При этом электростатический потенциал должен быть достаточно высок, в то время как указанные отличия потенциала мало влияют на распознавание промоторов РНК-полимеразой бактериофага Т7, хотя, по-видимому, играет для нее регуляторную роль [8].

Заключение

Таким образом, в работе был использован пример выживаемости мутантного штамма Т7 фага, не

содержащего в своем геноме гена РНК-полимеразы и приспособившегося к росту в штамме *E. coli*, содержащем экспрессируемый ген РНК-полимеразы Т3 фага. В результате проведенных исследований было показано, что выживаемость мутантного штамма Т7 бактериофага в этих условиях обусловлена приспособительными мутациями в поздних промоторах. Проведен также анализ нуклеотидных последовательностей и электростатических профилей мутантных промоторов. Установлено, что адаптация промоторов мутантного штамма Т7 фага к Т3 РНК-полимеразе связана с изменением электростатических свойств промоторной ДНК.

Авторы выражают благодарность Э.Г. Савельевой за всестороннюю техническую помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства инвестиций и инноваций Московской области, грант № 14-44-03683 и 16-04-01865.

Литература

1. Крутинин Г.Г., Крутинина Е.А., Камзолова С.Г., Осипов А.А. Бактериофаг λ : Электростатические свойства генома и его элементов // Молекулярная биология. — 2015. — Vol. 49. — No. 3. — P. 384–393. doi:10.7868/S0026898415030118.
2. Beck P.J., Gonzalez S., Ward C.L. and Molineux I.J. Sequence of bacteriophage T3 DNA from gene 2.5 through gene 9 // Journal of Molecular Biology. — 1989. — Vol. 210. — No. 4. — P. 687–701.
3. Brown J.E., Klement J.F., and McAllister W.T. Sequences of three promoters for the bacteriophage SP6 RNA polymerase // Nucleic Acids Research. — 1986. — Vol. 14. — No. 8. — P. 3521–3526.
4. Bull J.J., Springman R., and Molineux I.J. Compensatory evolution in response to a novel RNA polymerase: Orthologous replacement of a central network gene // Molecular Biology and Evolution. — 2007. — Vol. 24. — No. 4. — P. 900–908. doi:10.1093/molbev/msm006.
5. Charalampos K.G., Biris N., Bonvin A.M.J.J., Levandoski M.M., Guennegues M., Boelens R., and Kaptein R. Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes // Science. — 2004 (July 16). — Vol. 305. — No. 5682. — P. 386–389. doi:10.1126/science.1097064.
6. Kamzolova S.G., Sorokin A.A., Dzhelyadin T.D., Beskaraivay P.M., and Osypov A.A. Electrostatic potentials of *E. coli* genome DNA // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. — 2005. — Vol. 23. — No. 3. — P. 341–346.

7. Kamzolova S.G., Sorokin A.A., Osipov A.A., and Beskaravainy P.M. Electrostatic map of bacteriophage T7 genome. Comparative analysis of electrostatic properties of sigma(70)-specific T7 DNA promoters recognized by RNA-polymerase of *Escherichia coli* // *Biofizika*. – 2009. – Vol. 4. – No. 6. ISSN 0006-3029(print)|0006-3509(electronic).
8. Kamzolova S.G., Beskaravainy P.M., Osypov A.A., Dzhelyadin T.R., Temlyakova E.A., and Sorokin A.A. Electrostatic map of T7 DNA: Comparative analysis of functional and electrostatic properties of T7 RNA polymerase-specific promoters // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2014. – Vol. 32. – No. 8. – P. 1184–1192. doi:10.1080/07391102.2013.819298.
9. Kamzolova S.G., Osipov A.A., Beskaravainyi P.M., Dzhelyadin T.R., and Sorokin A.A. Regulation of promoter activity through electrostatic interactions with RNA polymerase // *Biophysics*. – 2007. – Vol. 52. – No. 2. – P. 172–178.
10. Kamzolova S.G., Sivozhelezov V.S., Sorokin A.A., Dzhelyadin T.R., Ivanova N.N., and Polozov R.V. RNA polymerase-promoter recognition. Specific features of electrostatic potential of «early» T4 phage DNA promoters // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2000. – Vol. 18. – No. 3. – P. 325–334. doi:10.1080/07391102.2000.10506669.
11. Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G., and Osypov A.A. The role of electrostatics in protein-DNA interactions in phage lambda // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2011. – Vol. 28. – No. 6. – P. 1139–1140.
12. Osypov A.A., Krutinin G.G., and Kamzolova S.G. DEPPDB – DNA electrostatic potential properties database: Electrostatic properties of genome DNA // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2010. – Vol. 8. – No. 3. – P. 413–425.
13. Osypov A.A., Krutinin G.G., Krutinina E.A., and Kamzolova S.G. DEPPDB – DNA electrostatic potential properties database. Electrostatic properties of genome DNA elements // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. – 2012. – Vol. 10. – No. 2. 1241004–1. doi:10.1142/S0219720012410041.
14. Polozov R.V., Dzhelyadin T.R., Sorokin A.A., Ivanova N.N., Sivozhelezov V.S., and Kamzolova S.G. Electrostatic potentials of DNA. Comparative analysis of promoter and nonpromoter nucleotide sequences // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 1999. – Vol. 16. – No. 6. – P. 1135–1143. doi:10.1080/07391102.1999.10508322.
15. Sorokin A.A., Osipov A.A., Beskaravainyi P.M., and Kamzolova S.G. Analysis of the distribution of the nucleotide sequence and electrostatic potential of the *Escherichia coli* genome // *Biofizika*. – 2007. – Vol. 52. – No. 2. – P. 223–227.
16. Sorokin A.A., Osypov A.A., Dzhelyadin T.R., Beskaravainy P.M., and Kamzolova S.G. Electrostatic properties of promoter recognized by *E. coli* RNA polymerase E sigma(70) // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. – 2006. – Vol. 4. – No. 2. – P. 455–467.
17. von Hippel P.H. Completing the view of transcriptional regulation // *Science*. – 2004 (July 16). – Vol. 305. – No. 5682. – P. 350–352. doi:10.1126/science.1101270.

PROMOTERS MUTANT STRAIN OF BACTERIOPHAGE T7 RNA TO DEMONSTRATE ATTACHMENT OF PHAGE T3 POLYMERASE BY CHANGING ITS ELECTROSTATIC PROPERTIES

A.A. OSYPOV^{1,2}, S.G. KAMZOLOVA¹

¹ *Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region;*

² *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow*

Mechanism of adaptation recognition of T7 DNA late promoters by nonspecific RNA polymerase from T3 bacteriophage was analyzed. The viability of T7 bacteriophage genome lacking its own RNA polymerase gene and adopted to growth in the bacterial host containing T3 bacteriophage RNA polymerase was considered. The viability of the mutilated T7 bacteriophage under these conditions is known to be due to compensatory mutations in T7 late promoters. Nucleotide sequences and electrostatic profiles of the mutated promoters were analyzed. The adaptation of T7 late promoters was shown to be determined by changing their electrostatic properties.

Keywords: promoter, electrostatic potential, RNA polymerase, bacteriophages T7, T3, recognition.

СБОРКА DE NOVO ТРАНСКРИПТОМА ЕДИНИЧНЫХ НЕЙРОНОВ СТАТОЦИСТОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

А.А. ОСИПОВ^{1,2*}, Н.А. АСЕЕВ¹, Е.А. ЧЕСНОКОВА¹, М.В. РОЩИН¹,
П.М. КОЛОСОВ¹, Н.В. БАЛЬ¹, П.М. БАЛАБАН¹

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва;

² Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область

В данной работе произведена сборка de novo тотального транскриптома рецепторных волосковых клеток — нейронов статоцистов, органов равновесия виноградной улитки *Helix lucorum*, секвенированного с помощью системы Ion Proton. Оптимизированы параметры сборки, выявлено отличие транскриптома специализированных рецепторных нейронов статоцистов от транскриптома тотальной нервной системы.

Ключевые слова: *Helix lucorum*, статоцисты, транскриптом, сборка de novo.

Введение

Виноградная улитка *Helix lucorum* является классическим модельным объектом, в том числе для исследования функций нервной системы (см., например [3, 6]). Однако ее изучение на современном биохимическом, молекулярно-биологическом и генетическом уровне ограничено из-за отсутствия секвенированного генома. Отсутствие полного секвенированного генома виноградной улитки приносит неизбежные трудности при анализе любых данных, связанных с утилизацией ее наследственной программы из-за нехватки реперной последовательности для первого звена реализации центральной догмы молекулярной биологии, а именно — кодирующей ДНК. Следует отметить, что попытки секвенирования данного генома уже предпринимались, но встретили значительные трудности, и, по-видимому, пройдет еще некоторый срок до ее конечного осуществления, что ставит вопрос о замещении недостающих данных другими методами.

Одним из подходов на этом пути является создание сборок транскриптомов конкретных органов, тканей и групп клеток [13, 14], что воплощает второе

звено реализации центральной догмы. Это значительно легче осуществить технически и позволяет получить дополнительные данные о путях и способах построения отдельных систем организма из единого плана, заложенного в общем геноме, а также проводить функциональный анализ их сигнальных и биохимических систем [15].

В настоящей работе произведена сборка de novo транскриптома рецепторных волосковых клеток — нейронов статоцистов, органов равновесия виноградной улитки [2]. Индивидуальным образцом в данном исследовании являлась тотальная мРНК всего из 13 клеток, что сближает его с так называемой «транскриптомикой единичных клеток» [12].

Материалы и методы

Для секвенирования были использованы виноградные улитки *Helix lucorum* (n=8), статоцист которых препарировали и выделяли содержащиеся в нем рецепторные волосковые клетки (13 нейронов). Использовалась тотальная мРНК из этих нейронов.

Секвенирование производилось на комплексе Ion Proton от Thermo Fisher Scientific Inc. Сырые данные чтений транскриптома после автоматической первичной обработки были получены с помощью системы Torrent Suite Software.

Дальнейшая обработка данных производилась на персональном компьютере с процессором Intel Core i7-3820 (4 ядра, 8 потоков) и 64 ГБ оперативной памяти под управлением операционной системы Debian GNU/Linux 7.0 wheezy (3.2.0-4-amd64).

© 2016 г. Осипов А.А., Асеев Н.А., Чеснокова Е.А., Рошин М.В., Колосов П.М., Баль Н.В., Балабан П.М.

* Автор для переписки:

Осипов Александр Александрович

к.б.н., ст.н.с.,

Институт биофизики клетки РАН,

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
142290 Пущино Московской области, Институтская, 3, ИБК РАН

E-mail: aosypov@gmail.com

Оценка качества сырых данных производилась с помощью программы FastQC [1] (параметры запуска – по умолчанию). Чистка данных производилась программой Trimmomatic [5] после оценки качества для выбора опций командной строки, влияющих на параметры чистки (типичная строка запуска: `~$ java -jar /tools/Trimmomatic-0.33/trimmomatic-0.33.jar SE -threads 7 -phred33 /data/raw_data/all.fastq /data/trimmed_data/all_tr.fastq ILLUMINACLIP:/data/adapters.fa:2:30:10 SLIDINGWINDOW:4:15 LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:25`). Далее была проведена нормализация данных для облегчения сборки с помощью программы Trinity [7, 9] (типичная строка запуска: `~$ perl /tools/trinityrnaseq-2.0.6/util/insilico_read_normalization.pl --seqType fq --JM 30G --max_cov 50 --single /data/trimmed_data/all_tr.fastq --output /data/norm_data --CPU 7`). Сборка транскриптома производилась программой rnaSPAdes [4] с параметрами по умолчанию (типичная строка запуска: `~$ /tools/rnaSPAdes-0.1.0-Linux/bin/rnaspades.py --careful --iontorrent -t 7 -m 30 -s /data/norm_data/single.norm.fq -o /data/ass_data/rnaspades`) или с добавлением опции командной строки «анализ единичной клетки» («--sc», single cell, на втором месте строки параметров) или с добавлением опции «опираться на готовую сборку» с использованием предоставленной коллегами (неопубликованной) сборки тотального транскриптома нервной системы (полученная полная строка запуска: `~$ /tools/rnaSPAdes-0.1.0-Linux/bin/rnaspades.py --careful --sc --iontorrent -t 7 -m 30 -s /data/norm_data/single.norm.fq --untrusted-contigs /data/total_ns.fa -o /data/ass_sc_ns_data/rnaspades`). Альтернативная сборка производилась программой Trinity (типичная строка запуска: `~$ /tools/trinityrnaseq-2.0.6/Trinity --seqType fq --max_memory 50G --single /data/norm_data/single.norm.fq --CPU 7 --output /data/ass_trinity --verbose --inchworm_cpu 7`). Параметры сборок оценивались программой QUAST [8] (типичная строка запуска: `~$ /tools/quast-3.0/quast.py -M 0 --threads 7 /data/total_ns.fa -o /data/quast_reports/total_ns`). Для дальнейшего картирования сборки индексировались программой Bowtie [11] (типичная строка запуска: `~$ /tools/bowtie2-2.2.5/bowtie2-build /data/ass_data/rnaspades/scaffolds.fasta /data/scaff_data/scaffolds`). Картирование чтений индивидуальных образцов на общую сборку производилось программой TopHat [10] (типичная строка запуска: `~$ /tools/tophat-2.1.0.Linux_x86_64/tophat2 -p 1 -o /data/mapped_data/n1 /data/scaff_data/scaffolds /data/trimmed_data/n1_tr.fastq`).

Результаты и обсуждение

Секвенирование дало около 54,5 млн одноконцевых чтений длиной от 25 до 373 (мода 110–120) со средним качеством от 18 до 26 (по версии Sanger/Illumina 1.9). После чистки осталось около 40,5 млн чтений длиной от 25 до 289 (мода 80–90) со средним качеством от 22 до 27. Нормализация дала 25,3 млн фрагментов длиной 25–281 (мода 30–40) общей длиной 2 млрд п.о.

Вопреки традиционным представлениям о необходимости использования мощных вычислительных серверов или даже кластеров для проведения сборок de novo, такие сборки могут быть осуществлены и на базе персонального компьютера, хотя и довольно производительного (особенно критично это касается объема оперативной памяти). Характерные времена работы программ для обработки представленных в эксперименте данных при указанных в методике конфигурациях были примерно такие:

- Анализ исходных данных (fastQC): 1 мин./образец.
- Чистка данных (Trimmomatic): 1 мин./образец.
- Нормализация (Trinity): 30 мин./все образцы.
- Сборка транскриптома (rnaSPAdes): 8 часов/сборку.
- Сборка транскриптома (Trinity): 23 часа/сборку.
- Оценка качества сборки (QUAST): 1 мин./сборку.
- Индексирование сборки (Bowtie): 1 мин./сборку.
- Картирование образцов (TopHat2): 30 мин/образец.

Следует отметить, что наиболее времяемкие процессы сборки могут быть возобновлены практически с текущего места в случае непредвиденного прерывания, например, при перебоях поставок электричества или аварийном завершении программ из-за проблем с оперативной памятью, вызванных, к примеру, указанием излишне высокого ее потребления в опциях командной строки.

Анализ исходных сырых данных по индивидуальным чтениям конкретных образцов выявил проблемность изучаемого объекта для доступного технического вооружения, подкрепляя ранее встреченные трудности на пути секвенирования целого генома. В частности, это касается, по-видимому, использования для секвенирования данного полного транскриптома платформы Ion Proton, которая дала относительно невысокий процент качественных чтений. Возможно, использование значительно более дорогостоящего или даже еще не разработанного оборудования поможет решить эту проблему в будущем.

Характеристики полученных сборок приведены в таблице 1. Следует обратить внимание на про-

грессирующее улучшение параметров сборок по мере использования опций «анализ единичной клетки» и «опираться на готовую сборку» программы maSPAdes и кардинальное улучшение (однако, по-видимому, за счет излишнего мельчения) при использовании программы Trinity.

Картирование индивидуальных чтений образцов выявило прогрессивное увеличение процента покрытия при использовании программы maSPAdes с настройками

по умолчанию (среднее покрытие — 44,9875%), затем — с использованием опции командной строки «анализ единичной клетки» (среднее покрытие — 45,1875%), еще более — при добавлении опции «опираться на готовую сборку» (среднее покрытие — 46,325%). Наконец, максимальный процент покрытия со значительным отрывом (56,1625%) был достигнут при использовании программы Trinity с единственно доступными настройками по умолчанию.

Таблица 1

Характеристики полученных сборок

Сборка	ass	sc	sc+NC	Trinity	NC
всего контигов	59273	59308	58142	248182	2065601
контигов ≥ 1000 по	5162	5165	5694	4813	32349
общая длина	32118642	32130804	32323607	93622478	338447864
длина ≥ 1000 по	6973004	6974353	8077421	6500058	57218292
максимальный контиг	4575	4575	8758	5230	15939
GC (%)	41,78	41,78	41,83	41,64	41,05
N50	614	614	636	371	222
N75	432	432	438	283	100
L50	17007	17013	16007	82100	306406
L75	32726	32736	31479	154857	913587
N на 100 тыс. по	1,24	1,24	1,24	0,00	0,00

Примечание: ass — сборка программой maSPAdes с настройками по умолчанию; sc — сборка программой maSPAdes с использованием опции командной строки «анализ единичной клетки»; sc+NC — сборка программой maSPAdes с использованием опции командной строки «анализ единичной клетки» при добавлении опции «опираться на готовую сборку», в данном случае — тотального транскриптома нервной системы; Trinity — сборка программой Trinity; NC — сборка тотального транскриптома нервной системы

Эти результаты объясняются, во-первых, малым количеством клеток, взятых для анализа (для чего и предназначена опция «анализ единичной клетки»). Следует отметить, что данная опция заметно улучшает результаты транскриптомного анализа не только для документированного случая единичных клеток, но и для малых групп порядка десятка штук, как это произошло в нашей ситуации. Дальнейший прогресс вызван, по-видимому, особенностями реализации программного ал-

горитма анализа, способствующего повышению точности (не в ущерб для производительности) за счет опоры на предоставленную полученной другими способами уже готовую сборку аналогичного транскриптома. Показателем также низкий процент покрытия сборок, полученных при использовании только чтений одного индивидуального образца, очевидно, объясняющийся недостатком данных для уверенного объединения индивидуальных чтений в более крупные агрегаты сборок.

Средний процент чтений индивидуальных образцов, картированных на разные варианты сборки

Сборка	HC	ass	sc	sc+HC	Trinity	self
% картирования	27,65	44,9875	45,1875	46,325	56,1625	44,3

Примечание: обозначение сборок см. таблицу 1; self — сборка программой *maSPAdes* с настройками по умолчанию, использующая только группу чтения данного индивидуального образца

Наилучший результат был, однако, получен при использовании другого программного продукта — Trinity, значительно более раннего времени выпуска, что может свидетельствовать о не до конца реализованном потенциале разработки данного класса программного обеспечения и существенных противоречиях между требованиями полноты и безошибочности анализа и техническими ограничениями на расчетную мощность доступных вычислительных систем. В то же время надо отметить, что размер полученных сборок (*maSPAdes* vs Trinity) отличается почти в пять раз, в то время как эффективность покрытия — всего на 20%, что находит свое отражение и в статистике распределения по длине полученных при сборках контигов. Наконец, не следует забывать и о троекратно большем времени сборки программой Trinity. Все это лишней раз демонстрирует неустоявшийся баланс между разными подходами к анализу транскриптомных данных.

Результаты сравнения картирования индивидуальных образцов на разные сборки выявили показательное различие транскриптомов тотальной нервной системы и выделенной группы нейронов статочистов. Среднее значение покрытия для тотальной нервной системы на четверть меньше, чем для специфических сборок, несмотря на троекратное превышение размера тотальной сборки по отношению к сборке Trinity и почти на порядок — для сборок *maSPAdes*. Очевидно, что экспрессионные профили статочистов отличаются от усредненного значения для всей нервной системы, что может служить показателем функциональной специализации данной группы нервных клеток. Дальнейший расширенный анализ может выявить конкретные характерные группы белков и прояснить молекулярную специфику этой популяции нейронов, что имеет принципиальное значение для понимания биологических механизмов функционирования рассматриваемой структуры.

После завершения функционального анализа и проведения аннотирования релевантные сборки транскриптома будут депонированы в соответствующих общедоступных базах данных (см. *Helix lucorum*, statocysts).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 14-25-00072.

Литература

1. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. — 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
2. Balaban P.M., Malyshev A.Y., Zakharov I.S., Aseev N.A., Bravarenko N.I., Ierusalimsky V.N., Samarova A.I., Vorontzov D.D., Popova Y., and Boyle R. Structure and function of the snail statocyst system after a 16-day flight on Foton-M-2 // *Journal of Gravitational Physiology*. — 2006. — Vol. 13. — No. 1. — P. 201–204.
3. Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. — 2002. — Vol. 26. — No. 5. — P. 597–630.
4. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *Journal of Computational Biology*. — 2012. — Vol. 19. — No. 5. — P. 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
5. Bolger A.M., Lohse M., and Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data // *Bioinformatics (Oxford, England)*. — 2014. — Vol. 30. — No. 15. — P. 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
6. Gainutdinova T.H., Tagirova R.R., Ismailova A.I., Muranova L.N., Samarova E.I., Gainutdinov Kh.L., and Balaban P.M. Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis // *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*. — 2005. — Vol. 12. — No. 6. — P. 620–625. doi:10.1101/lm.25705.
7. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., et al. Trinity: Reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq Data // *Nature Biotechnology*. — 2011. — Vol. 29. — No. 7. — P. 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.
8. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., and Tesler G. QUAST: Quality Assessment Tool for genome assemblies // *Bioinformatics*. — 2013. — Vol. 19. btt086. doi:10.1093/bioinformatics/btt086.

9. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood Ph.D., Bowden J., Couger M.B., et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: Reference generation and analysis with trinity // Nature Protocols. — 2013. — Vol. 8. — No. 8. doi:10.1038/nprot.2013.084.
10. Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., and Salzberg S.L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions // Genome Biology. — 2013. — Vol. 14. R36. doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36.
11. Langmead B., and Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nature Methods. — 2012. — Vol. 9. — No. 4. — P. 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.
12. Liu S., and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: Recent advances and remaining challenges // F1000Research. — 2016. — Vol. 5. doi:10.12688/f1000research.7223.1.
13. Lovén J., Orlando D.A., Sigova A.A., Lin Ch.Y., Rahl P.B., Burge Ch.B., David L. Levens D.L., Lee T.I., and Young R.A. Revisiting global gene expression analysis // Cell. — 2012. — Vol. 151. — No. 3. — P. 476–482. doi:10.1016/j.cell.2012.10.012.
14. Marguerat S., and Bähler J. RNA-Seq: From technology to biology // Cellular and Molecular Life Sciences. — 2010. — Vol. 67. — No. 4. — P. 569–579. doi:10.1007/s00018-009-0180-6.
15. Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B.J., Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation // Nature Biotechnology. — 2010. — Vol. 28. — No. 5. — P. 511–515. doi:10.1038/nbt.1621.

DE NOVO ASSEMBLY OF THE TRANSCRIPTOME OF INDIVIDUAL SNAIL STATOCYSTS NEURONS

A.A. OSYPOV^{1,2}, N.A. ACEYEV¹, E.A. CHESNOKOVA¹, M.V. ROSHCIN¹,
P.M. KOLOSOV¹, N.V. BAL¹, P.M. BALABAN¹

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow;

² Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region

We present the de novo assembly of total transcriptome of receptor hair cells — neurons of statocysts, the balance organ of snail *Helix lucorum*, sequenced using the Ion Proton system. Assembling parameters were optimized, the difference between transcriptomes of specialized receptor neurons of statocysts from the transcriptome of total nervous system was revealed.

Keywords: *Helix lucorum*, statocysts, transcriptome, de novo assembling.

ПОЛУЧЕНИЕ ЖИДКОГО ГУМИНОВОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ВЕРМИКОМПОСТА И ВИНОГРАДНОЙ ВЫЖИМКИ

А.Т. ТЕЛЕШЕВ^{1*}, И.А. МАРЫНКИН², И.Н. ТИТОВ³, Я.Д. ЧАГАВА¹, Г.З. КАЗИЕВ¹

¹ ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»,

² ООО ИК «Восточная Европа», Москва;

³ ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени А.Г. и Н.Г. Столетовых», Владимир

Описана усовершенствованная технология получения жидкого гуминового биопрепарата на основе вермикомпоста и виноградных выжимок с помощью процесса механо-акустической активации суспензий с целью усиления его биологической и физиологической активности.

Ключевые слова: вермикомпост, виноградные выжимки, жидкие гуминовые препараты, кавитация.

Введение

Применение вермикомпоста (биогумуса) в качестве органического удобрения и жидких гуминовых биопрепаратов, полученных на его основе, в органическом земледелии во многих странах стремительно увеличивается после многочисленных публикаций положительных результатов экспериментов по выращиванию различных культур в условиях открытого и закрытого грунтов [4, 8, 10, 11, 14].

Вермикомпосты стали широко использоваться для получения различных жидких гуминовых препаратов, так как они являются возобновляемым источником гумусо-содержащего сырья и содержат в себе, кроме гуминовых веществ (гуминовые кислоты и фульвокислоты), очень широкий спектр биологически и физиологически активных соединений: органические кислоты, аминокислоты, регуляторные пептиды, витамины, гормоны, различные метаболиты — продукты жизнедеятельности микроорганизмов, обитающих в вермикомпостах, а также живую почвенную (ризосферную и микоризную) микрофлору. Они считаются в настоящее время биофунгицидными препаратами и являются эффективными средствами повышения продуктивности и иммунитета растений [13].

Для получения жидких биопрепаратов на основе вермикомпостов используют три типа способов обработки исходного сырья:

- биологические (ферментация водных суспензий);
- химические (экстракция щелочными или кислотными реагентами);
- физические (экстракция с помощью ультразвука и кавитации).

В настоящее время ряд российских компаний производит и продает много видов жидких гуминовых препаратов на основе вермикомпостов, используя технологию щелочной экстракции. По своим основным качествам они не могут и не должны существенно отличаться друг от друга, так как используются практически близкие технологии их получения. Общим недостатком получения гуминовых препаратов на основе вермикомпостов с использованием щелочного способа экстракции является то, что в готовом продукте содержание гуминовых веществ и физиологически активных веществ находится на невысоких уровнях концентраций, поскольку более 2/3 исходного сырья остается в твердой фазе и вследствие этого эксплуатационные характеристики таких препаратов при крупномасштабном применении, транспортировке и хранении неудовлетворительны [9].

Одним их эффективных методов интенсификации химико-технологических процессов в жидкостях является кавитационное воздействие на обрабатываемую среду в водной среде в кавитационных аппаратах. Кавитационный измельчитель — это принципиально новый вид оборудования, используемый в производстве эмульсий и суспензий различного назначения. Это явление соз-

© 2016 г. Телешев А.Т., Марынкин И.А., Титов И.Н., Чагава Я.Д., Казиев Г.З.

* Автор для переписки:

Телешев Андрей Терентьевич

доктор химических наук, профессор,

ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»

E-mail: teleshevat@rambler.ru

дается искусственно в специальных реакторах. Под воздействием особых условий в жидкой среде возникают ударные волны и другие гидродинамические эффекты. Многофакторное воздействие состоит из трех основных видов — механического, акустического и теплового. При механическом и акустическом воздействии твердые частицы измельчаются, что приводит к увеличению поверхности фазового контакта. Нагрев суспензии происходит в локальном объеме зазора между ротором и статором за счет сдвиговых течений. Все эти воздействия способствуют увеличению поверхности фазового контакта, относительных скоростей движения фаз и уменьшению величины диффузионного слоя [2].

Известно, что виноградные выжимки, являющиеся отходами винодельческой промышленности, содержат в себе ряд витаминов, макро- и микроэлементов, белков, жирных кислот, биологически активных веществ, например, флавоноидов, антоцианов [1, 3, 5]. Однако выделение и перевод в жидкую фазу этого ценного комплекса веществ из такого вида сырья и их практическое использование осложняются весьма прочной волокнистой структурой семенных оболочек виноградных косточек, которые составляют 60–62% от массы сухих выжимок. При этом температурный режим обработки виноградных выжимок должен быть щадящим во избежание потери биологически активных веществ [12].

Целью данной работы является усовершенствование процесса получения жидких препаратов на основе вермикомпоста (биогумуса) и виноградных выжимок для усиления их биологической и физиологической активности. Для этого в основу энергосберегающей технологии получения жидких биопрепаратов на основе композиции «вермикомпост — виноградные выжимки» был положен процесс механо-акустической активации суспензий.

Материалы и методы

Механо-акустическая активация в условиях само-разогрева реакционной смеси проводилась с помощью роторно-пульсационного аппарата (РПА) «Дельта-ротор» (производство ООО НПП «Авиатехника», рабочая частота вращения ротора составляет 3000 мин.⁻¹, максимальная производительность по воде — 20 м³/ч). Это позволяет быстро и полно сформировать в водной среде требуемую дисперсию.

Измерение светорассеяния дисперсий проводилось с помощью прибора Zetasizer Nano ZS Zen3600 «Malvern». Лазерный источник света, установленный в приборе, характеризуется высоким (до 0,1 мкс) времен-

ным разрешением. Расчет зависимости средних коэффициентов корреляции между результатами измерения от временного промежутка между этими измерениями позволяет определить средние скорости диффузии частиц в образце и гидродинамические диаметры частиц, соответственно.

В качестве сырья использовали вермикомпост компании ООО ИК «Восточная Европа» (Россия, г. Москва) «ОрганиКА Лайф» марки А, имеющий средний размер частиц до 3 мм, влажность 49%, и выжимки виноградной лозы сорта «Ачандарский красный» (средний размер частиц до 2 см, влажность 9%). Жидкой средой при диспергировании служил водный раствор аммиака (ОСЧ 25-5, ГОСТ 24147-80).

Результаты и обсуждение

На первой стадии с помощью РПА исходный вермикомпост обрабатывали водой, забуференной аммиаком до значений рН 9,5–10,9 при массовом соотношении вермикомпост : вода, равном 1:3–4, и температуре 55–60 °С в течение 2–3 мин. На второй стадии дезинтеграции в пульпу, полученную на первой стадии, не выгружая ее из РПА и не меняя режим работы аппарата, загружали виноградные выжимки (массовое соотношение виноградные выжимки — вермикомпост 1:6–9) и обрабатывали смесь в течение 2–5 мин. при температуре 55–60 °С. После окончания процесса пульпу, охлажденную до 30 °С, сливали с учетом количества и регистрировали ее активную кислотность (рН 7,5). Следует отметить, что снижение щелочных значений рН с 9,5–10,9 до близкого к нейтральному значению суспензий (рН 7,5) при получении композиции «вермикомпост-виноградных выжимок» происходило без дополнительного внесения каких-либо кислот. Процесс нейтрализации пульпы преимущественно был обусловлен гидролизом липидов виноградного масла, содержащегося в виноградном семени выжимок, и последующим солеобразованием жирных кислот [7].

Контроль за дисперсностью пульпы осуществляли с помощью метода динамического светорассеяния. Данные динамического светорассеяния определенно указывают на организацию принципиально новых молекулярных ансамблей дисперсий, полученных на основе вермикомпоста и виноградных выжимок. Результаты анализа полученных нами дисперсий представлены в виде зависимости доли от общего объема всех дисперсных частиц, приходящейся на частицы данного диаметра (рис. 1, 2).

Так, для дисперсной системы вермикомпоста в водной среде при 25 °С свойствен тримодальный характер объемного распределения частиц по размерам с максимумами пиков около 150, 940 и 5600 нм. Вклады этих трех пиков по интенсивности светорассеяния составляли 3,3, 63,5 и 33,2%, соответственно (рис. 1). Для дисперсной системы «вермикомпост — виноградные выжимки» характер объемного распределения частиц по размерам существенно меняется. Пик основной моды — вклад 99,5% наблюдается в области около 4500 нм, вклад минорного сигнала с максимумом 840 нм составляет лишь 0,5% (рис. 2).

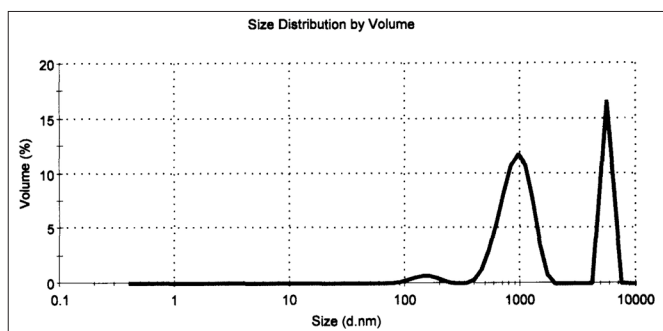


Рис. 1. Объемное распределение частиц по размерам для водной дисперсии вермикомпоста, полученной с помощью РПА

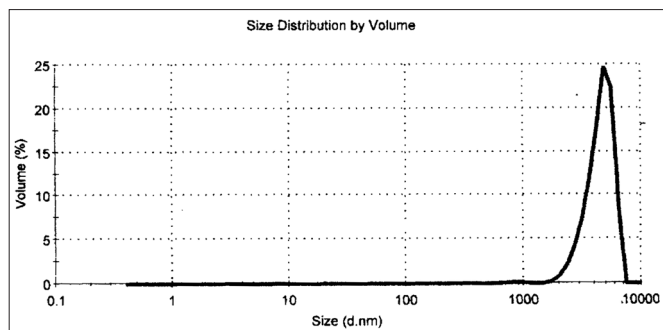


Рис. 2. Объемное распределение частиц по размерам для водной дисперсии «вермикомпост — виноградные выжимки», полученной с помощью РПА

Биотестирование полученного жидкого биопрепарата на основе вермикомпоста — виноградных выжимок проводили по общепринятой методике. Для проведения биотестирования семена выбранных растений (горох, чечевица, пшеница) помещали на стерильную марлю и замачивали раствором исследуемого препарата, содержащего 1 мл образца биопрепарата в 100 мл бутилированной питьевой воды. Измерения длины проростков и корней проводили каждые сутки. Температура — 21–22 °С.

Установлено, что энергия прорастания семян (гороха, чечевицы), обработанных препаратом, увеличивается на

20–25%. Энергия развития корневой системы возрастает на 40–50%.

Рисунок 3 иллюстрирует степень развития семени пшеницы в контрольном опыте (вермикомпост) и под влиянием полученного нами биопрепарата (биокомпозит) на 5-й день наблюдения.

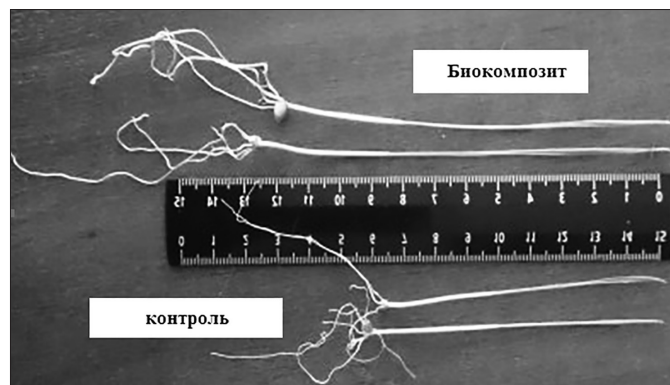


Рис. 3. Степень развития семени пшеницы под влиянием препарата «вермикомпост — виноградные выжимки» (биокомпозит) и в контрольном опыте (контроль)

Заключение

Таким образом, предложенный нами способ дает возможность получать дисперсию биокомпозита на основе вермикомпоста и виноградных выжимок высокого качества. За счет содержащегося в виноградных выжимках жесткого виноградного семени, играющего в процессе роль микроизмельчителя, удалось существенно упростить технологию процесса, сделать его экономически более выгодным, так как процесс в РПА сопровождается высвобождением виноградного масла и снижением поверхностного натяжения веществ, граничащих с данной средой. Процесс осуществляется в условиях саморазогрева пульпы и не требует подвода тепла извне; при этом происходит пастеризация продукта, позволяющая увеличить срок его хранения. На данный способ получения жидкого гуминового биопрепарата на основе вермикомпоста и виноградных выжимок был получен российский патент на изобретение [6].

Не вызывает сомнения положительное влияние предлагаемого биокомпозита, содержащего экстракт из вермикомпоста и виноградных выжимок, на переход семян от состояния покоя к вегетативному росту зародыша и формирующегося из него проростка.

Применение различных препаратов на основе вермикомпостов — важный инструмент для органических производителей и фермеров, которые не желают использовать минеральные удобрения и агрохимикаты

при выращивании сельскохозяйственной продукции. Комплексное применение вермикомпостов и жидких гуминовых биопрепаратов на основе вермикомпостов позволит сельскохозяйственным производителям от садовода и огородника до крупного фермера выращивать экологически безопасную продукцию, так называемые «биоовощи» и «биофрукты», которые имеют высокий спрос у потребителя. Можно предполагать, что такие биопрепараты в скором времени составят достойную альтернативу и конкуренцию минеральным удобрениям и агрохимикатам.

Литература

1. *Гишвили М.Д., Танащук Т.Н.* Перспективы использования виноградной выжимки как источника биологически активных добавок // *Виноделие и виноградарство*. — 2005. — № 6. — С. 37–38.
2. *Ириков О.В., Промтов М.А.* Установка для получения водной дисперсии биогумуса. Патент на полезную модель №: 105905 от 27.06.2011.
3. *Кондратьев Д.В., Щеглов Н.Г.* Оптимизация процессов извлечения биологически активных веществ из виноградных выжимок // *Изв. вузов. Пищ. технология*. — 2008. — № 1. — С. 45–46.
4. *Мельник І.П., Колісник Н.М., Шувар І.А., Сендецький В.М., Тітов І.М., Фарзах Фаваз Салім Фатах.* Дощові черв'яки: наукові аспекти вирощування і практичне застосування. Монографія. — Івано-Франківськ: Симфонія форте, 2015. — 444 с.
5. *Тагирова П.Р., Касьянов Д.Г.* Переработка виноградных выжимок и виноградных семян с использованием жидкого диоксида углерода // *Изв. вузов. Пищ. технология*. — 2010. — № 2–3. — С. 60–62.
6. *Телешев А.Т., Марынкин И.А., Титов И.Н., Чагава Я.Д., Казиев Г.З.* Способ получения жидкого стимулятора роста и развития растений из гумусосодержащих веществ. Патент РФ № 2600748 от 27.10.2016.
7. *Телешев А.Т., Чагава Я.Д., Асатурян Ж.М., Казиев Г.З., Кудрявцев А.Б.* Совершенствование процесса получения растительного масла из семян винограда // *Научное обозрение*. — 2015. — № 15. — С. 219–224.
8. *Титов И.Н.* Биопрепараты на основе вермикомпостов: получение, применение и перспективы / Проблемы механизации агрохимического обслуживания сельского хозяйства: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Инновационные агротехнологии и средства механизации для развития органического земледелия», 2–3 декабря 2015 г., Рязань, ФГБНУ ВНИИМС. — Рязань, 2015. — С. 58–65.
9. *Титов И.Н.* Способ получения биостимулятора роста и развития растений из гумусосодержащих веществ. Патент РФ № 2253641 от 25.12.2002 г.
10. *Arancon N., Edwards C.A.* The use of vermicomposts as soil amendments for production of field crops // In: «Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management». — CRS Press, Taylor and Francis Group, 2011. — P. 129–152.
11. *Arancon N.Q., Edwards C.A., Dick R., Dick L.* Vermicompost tea production and plant growth impacts // *Biocycle* (November). — 2007. — P. 51–52.
12. *Khanal R.C., Howard L.R., Prior R.L.* Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins // *Food Res. Int.* — 2010. — Vol. 43. — No. 5. — P. 1464–1469.
13. *Salter C.E., Edwards C.A.* The production of vermicompost aqueous solutions or teas // In: *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*. — CRS Press, Taylor and Francis Group, 2011. — P. 153–164.
14. *Titov I.N., Belik E.V.* Liquid preparations based on the vermicomposts: preparation, application and prospects // *Third International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies Tenth International Conference daRostim «Humic Substances and Other Biologically Active Compounds in Agriculture» HIT-daRostim-2014 November 19–23, 2014, Lomonosov Moscow State University*. — Moscow, 2014. — P. 165–166.

PRODUCTION OF LIQUID HUMIC BIOPREPARATION ON THE BASIS OF VERMICOMPOST, AND GRAPE POMACE

A.T. TELESHEV, I.A. MARYNKIN, I.N. TITOV, Y.D. CHAGAVA, H.Z. KAZIEV

¹ *Moscow State Pedagogical University*

² *LLC IC «Eastern Europe», Moscow;*

³ *A.G. and N.G. Stoletovs Vladimir State University, Vladimir*

We describe an improved technology for producing liquid humic biopreparation based on the vermicompost and grape marc through a process of mechanical-acoustic activation of the suspensions in order to strengthen its biological and physiological activities.

Keywords: vermicompost, grape marc, liquid humic preparations, cavitation.

МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО ГИПОМЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ В МОЗГУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.И. САМОХИНА¹, И.Е. МЫСИН¹, А.А. ОСИПОВ^{2,3}, А.Е. МАЛЬКОВ¹,
С.И. ПАСКЕВИЧ¹, М.В. МОЛЧАНОВ¹, И.Ю. ПОПОВА^{1*}

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.;*

² *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва;*

³ *Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.*

Разработан метод создания хронического гипометаболизма глюкозы в мозгу экспериментальных животных путем хронического введения в желудочки мозга 2-дезоксид-глюкозы (2-ДГ, неметаболизируемого аналога глюкозы). Показано, что выраженные патологические изменения в электрической активности мозга (пароксизмальная активность) и в биохимических параметрах регистрируются уже после одного месяца ежедневных введений 2-ДГ. Эти результаты являются первым доказательством того, что недостаточная утилизация глюкозы в мозгу может служить триггерным механизмом при формировании нейропатологии. Предлагаемая модель может использоваться как для исследований вклада гипометаболизма глюкозы в развитие нейродегенеративных заболеваний, так и для поиска путей его компенсации.

Ключевые слова: мозг, нейропатология, гипометаболизм глюкозы, суммарные полевые потенциалы, ЯМР, митохондрии, 2-дезоксид-Д-глюкоза.

Введение

С помощью метода позитронно-эмиссионной томографии было показано, что гипометаболизм глюкозы в мозгу является характерной чертой многих нейродегенеративных заболеваний, таких как возрастные нарушения памяти, минимальные мозговые дисфункции (ММД), болезнь Альцгеймера, эпилепсия, болезнь Паркинсона, атаксия Фридрейха, рассеянный склероз, вызванные анестезией нарушения памяти, болезнь Хантингтона и многие другие (Kudin et al., 2009 [14]; Pan et al., 2008 [20]; Jeon et al., 2016 [11]). В последнее десятилетие появились исследования, указывающие на то, что для ряда неврологических заболеваний гипометаболизм глюкозы в мозгу может являться не только следствием развившейся патологии, но и вносить прямой вклад в развитие этих заболеваний (Pan et al., 2008 [20]; Jupp et al., 2012 [12]; Lee et al., 2012 [17]; Daulatzai, 2016 [8]). Действительно, многие функции мозга напрямую зависят от состояния

энергетического гомеостаза и недостаточное обеспечение или утилизация энергетических субстратов может быть основной причиной нейрональной дисфункции. Так, было установлено, что подавление транспорта глюкозы после введения стрептозотоцина ведет к снижению долговременной синаптической пластичности и когнитивным нарушениям у мышей, а экспериментальная гипоперфузия у крыс приводит к развитию нейродегенеративных нарушений в гиппокампе (Stanojlović, 2016 [25]). Однако механизмы, связывающие истощение энергетических запасов клетки с нейропатологией, до настоящего времени во многом остаются неизученными. Очевидно, что для исследования этой важной проблемы необходима модель хронического гипометаболизма глюкозы в мозгу экспериментальных животных.

Цель настоящей работы состояла в разработке модели хронического частичного гипометаболизма глюкозы в мозгу экспериментальных животных. В качестве химического агента для создания такой модели была выбрана 2-дезоксид-Д-глюкоза (2ДГ) — конкурентный аналог глюкозы, который утилизируется клетками через глюкозные транспортные механизмы (Bidder, 1968 [2]; Bachelard, 1971 [1]; Oldendorf, 1971 [19]). На первой стадии гликолиза гексокиназа преобразует 2ДГ в 2-ДГ-6-фосфат, приводя к ингибированию фосфоглюкоизомеразы на второй стадии гликолиза и блокируя образование фруктозо-6-фосфата (Crane and Sols, 1954 [7]; Wick et

© 2016 г. Самохина Е.И., Мысин И.Е., Осипов А.А., Мальков А.Е., Паскевич С.И., Молчанов М.В., Попова И.Ю.

* **Автор для переписки:**

Попова Ирина Юрьевна

к.б.н., ст.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

142290 Пущино Московской области, Институтская, 3

E-mail: I-Yu-Popova@yandex.ru

al., 1955 [26]; Brown, 1962 [5]; Bachelard et al., 1971 [1]; Stafstrom et al., 2008 [24]). Прямое введение 2-ДГ в мозг вызывает локальную клеточную гликопению в отсутствие системной гипогликемии (Borg et al., 1999 [4]) и исключает возможный негативный эффект от подавления гликолиза на другие органы. Создание такой модели необходимо как для исследований вклада гипометаболизма глюкозы в развитие нейродегенеративных заболеваний, так и для поиска путей его компенсации.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009. В качестве экспериментальных животных использовали взрослых крыс Уистар (масса тела 230–250 г в начале экспериментов).

Эксперименты были проведены на двух группах крыс: контрольных ($n=12$) и с хроническим гипометаболизмом глюкозы в мозге ($n=17$).

Животным под общей анестезией (золетил, 0,1 мг/100 г, и ксилазин, 0,05 мг/100 г) проводили операции по имплантации канюли в желудочки мозга и электродов (нихром, 50 мкм) для регистрации суммарных полевых потенциалов в гиппокампе. Стереотаксические координаты были следующие: AP= -0,8; L=1,0; H=3,0 для канюли и AP= -3,6; L=2,0; H=3,6 для электрода на ипсилатеральной стороне (Paxinos G. & Watson C. 1998 [21]). Референтный электрод вкручивался в затылочную кость.

Через неделю после операции начинали моделировать хронический гипометаболизм глюкозы в мозгу экспериментальных животных путем ежедневного введения в желудочки мозга 2-дезоксид-глюкозы (22 мМ/2,5 мкл). В качестве контрольной группы использовались крысы с внутрижелудочковым введением 0,9% NaCl (2,5 мкл). Внутрижелудочковые введения продолжались в течение месяца, после чего проводили функциональные тесты: анализ суммарных полевых потенциалов (СПП) в гиппокампе и тест «порог судорожной активности» (выраженность судорожных реакций на однократную внутрибрюшинную инъекцию пентилентетразола в дозе 35 мг/кг (Fischer W., Kittner H., 1998 [10]). Далее мозг извлекали на биохимический анализ ткани (ЯМР, функциональное состояние внесинаптических митохондрий мозга). План эксперимента представлен на рисунке 1А.

СПП гиппокампа регистрировали у всех животных в контрольном состоянии и через месяц ежедневного введения хлорида натрия или 2-ДГ. Все

записи были сделаны на активных, не ограниченных в движении животных. Средняя продолжительность эксперимента составляла около 2,5 ч. СПП усиливали (Grass Instrument, USA), фильтровали (полоса пропускания верхних частот 0,1 Гц, частота семплирования 5 кГц) и записывали с помощью программного обеспечения DataPack2k (RUN Technologies, USA). Проводили оценку частоты и длительности высокочастотной активности (риплс-осцилляций, 70–200 Гц), свидетельствующих о развитии патологических процессов в гиппокампе. Статистическая значимость оценивалась с помощью парного теста Уилкоксона (уровень значимости $p < 0,05$).

ЯМР-анализ проводили по следующей методике: после декапитации мозг замораживали в жидком азоте. К замороженным образцам добавляли равный вес хлороформа (CHCl_3), 700 мкл D_2O , далее гомогенизировали со стеклянным шаром в шейкере в течение 30 с и центрифугировали при 15000 г в течение 5 мин. К 540 мкл супернатанта добавляли раствор 3-триметилсилил [2,2,3,3- D_4] пропионата (ТСП, 60 мкл 4 мкМ в D_2O), перемешивали и помещали в ЯМР пробирку. 1D и 2D COSY спектры регистрировали на Avance III 600 ЯМР-спектрометр (Bruker), работающий при частоте 600 МГц для протонов с использованием стандартных последовательностей импульсов, в пробирке $D=5$ мм при 298 °К. Все значимые сигналы в спектрах ЯМР были идентифицированы и атрибутированы метаболитам с использованием спектральной базы данных компании Bruker «AMix» и базы данных HMDB (Human Metabolite Database).

Для выделения митохондрий из ткани мозга крыс после декапитации ткань мозга быстро переносили в среду выделения (250 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES, 100 мМ K-EGTA, 0,1% BSA, pH 7,4), промывали от крови и гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали при 2000 г в течение 10 мин. Супернатант центрифугировали при 12000 г в течение 10 мин. Осадок суспендировали в среде без ЭГТА и БСА и центрифугировали при 12000 г в течение 10 мин. Содержание белка измеряли колориметрическим методом Лоури. Изменения митохондриального потенциала $\Delta\psi_{mit}$ оценивали путем измерения тушения флуоресценции родамина-123 (2 мкМ) при следующих условиях: суспензию митохондрий мозга крыс добавляли к среде реакции (10 мМ HEPES, 50 мкМ K-EGTA, 120 мМ KCl, 2 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4), 0,75 мкМ ротенона до концентрации 0,2 мг/мл белка. В качестве субстрата использовали 2 мМ сукцинат. АДФ (100 мкМ) добавлялся для инициации окислительного фосфорилирования

потенциала, расходующегося на фосфорилирование, что значительно уменьшало градиент протонов на внутренней мембране и увеличивало выход флуоресцирующего зонда из митохондрий.

Таблица 1

Оценка поведенческих судорог (в баллах) при однократной внутривentricularной инъекции пентилентетразола

0,9% NaCl		2-ДГ	
Контроль	Через 4 недели введения	Контроль	Через 4 недели введения
1,5	0,5	0,5	2,5
0,5	3	1,5	5 погиб
2	3	0,5	3
0,5	2,5	2,5	4
0,5	0,5	0,5	2,5
0,5	3	0,5	3,5
M=0,92±0,27	M=2,08±0,51	M=1±0,34	M=3,42±0,4*

Примечание: * различия достоверны при $p \leq 0,01$ (U-критерий Манна – Уитни)

Изменение интенсивности флуоресцирующего сигнала родамина-123 в зависимости от величины мембранного потенциала показано на рисунке 3А. После того как весь АДФ фосфорилировался и переходил в АТФ, мембранный потенциал восстанавливался и флуоресценция зонда снова снижалась.

В ходе работы мы измеряли скорость фосфорилирования АДФ по скорости восстановления флуоресценции родамина-123 после добавки АДФ. Установлено, что хроническое введение 2-ДГ привело к значительному снижению скорости фосфорилирования АДФ по сравнению со значениями контрольной группы животных (рис. 3Б). Для того чтобы оценить вклад мембранного потенциала в наблюдаемое снижение скорости, был использован разобщитель дыхательной цепи КЦХФГ, который вызывает высвобождение родамина-123 из митохондрий. Было выявлено, что интенсивность сигнала флуоресценции после разобщения митохондриальной дыхательной цепи по отношению к сигналу флуоресценции после стимулирования дыхания сукцинатом не меняется у двух групп животных (рис. 3В). Этот факт указывает на снижение синтеза молекул АТФ у экспериментальной группы животных в результате нарушения самой дыхательной цепи митохондрий или АТФ-синтетазы, но не за счет нарушения целостности мембраны и снижения ее барьерных для потенциала свойств.

Ранее было установлено, что эпилептиформной активности мозга предшествует резкое снижение АТФ и нарушение энергетического гомеостаза (Sacktor et

al., 1966 [22]; King et al., 1967 [13]). Главным источником АТФ в клетке служат митохондрии. Таким образом, синтез молекул АТФ зависит от состояния митохондриальной дыхательной цепи, которую образуют пять мультисубъединичных комплексов. Нарушение митохондрий, связанное с эпилептическим фенотипом, было выявлено при нескольких синдромах: митохондриальная энцефалопатия, миопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные эпизоды (MELAS), миоклонус-эпилепсия с разорванными красными волокнами (MERRF) (Bindoff & Engelsens, 2012) [3]. Целым рядом авторов было обнаружено нарушение работы митохондрий при формировании эпилептического фенотипа (Kunz, 2002 [16]; Kunz et al., 2000 [15]; Kudin et al., 2009 [14]).

В нашей работе было показано, что хроническое введение 2-ДГ в желудочки мозга приводит к снижению скорости фосфорилирования АДФ митохондриями. Этот факт подтверждает, что применяемое воздействие действительно ведет к снижению образования АТФ и нарушению энергетического гомеостаза в мозгу. Возможный механизм ингибирующего действия гипометаболизма глюкозы на митохондриальные дыхательные комплексы связан с торможением процессов синтеза белка посредством фосфорилирования фактора элонгации эукариот (eEF-2), что приводит к снижению экспрессии белков дыхательных комплексов митохондрий (Maus et al., 2006) [18].

Хронический гипометаболизм глюкозы в мозгу приводит к изменению уровня ряда метаболитов

Исследование образцов ткани мозга экспериментальных животных методом ЯМР спектроскопии выявило достоверные изменения в концентрации растворимых метаболитов, представленные в таблице 2. Обнаруженные изменения свидетельствуют об истощении энергетических запасов клеток мозга — снижении концентрации гликогена и аденозинфосфатов на фоне повышения аденозина. О нарушении митохондриального метаболизма также свидетельствуют снижение концентрации сукцината и повышение — фумарата. Метаболические нарушения сопровождаются изменениями концентрации нейротрансмиттеров (холин, ГАМК, аденозин), которые, вероятно, носят компенсаторный характер; однако подобная компенсация оказывается недостаточной для нормализации эпилептиформной активности, обнаруживаемой при регистрации СПП в головном мозге экспериментальных животных. Выявленные нарушения характерны для эпилептического мозга.

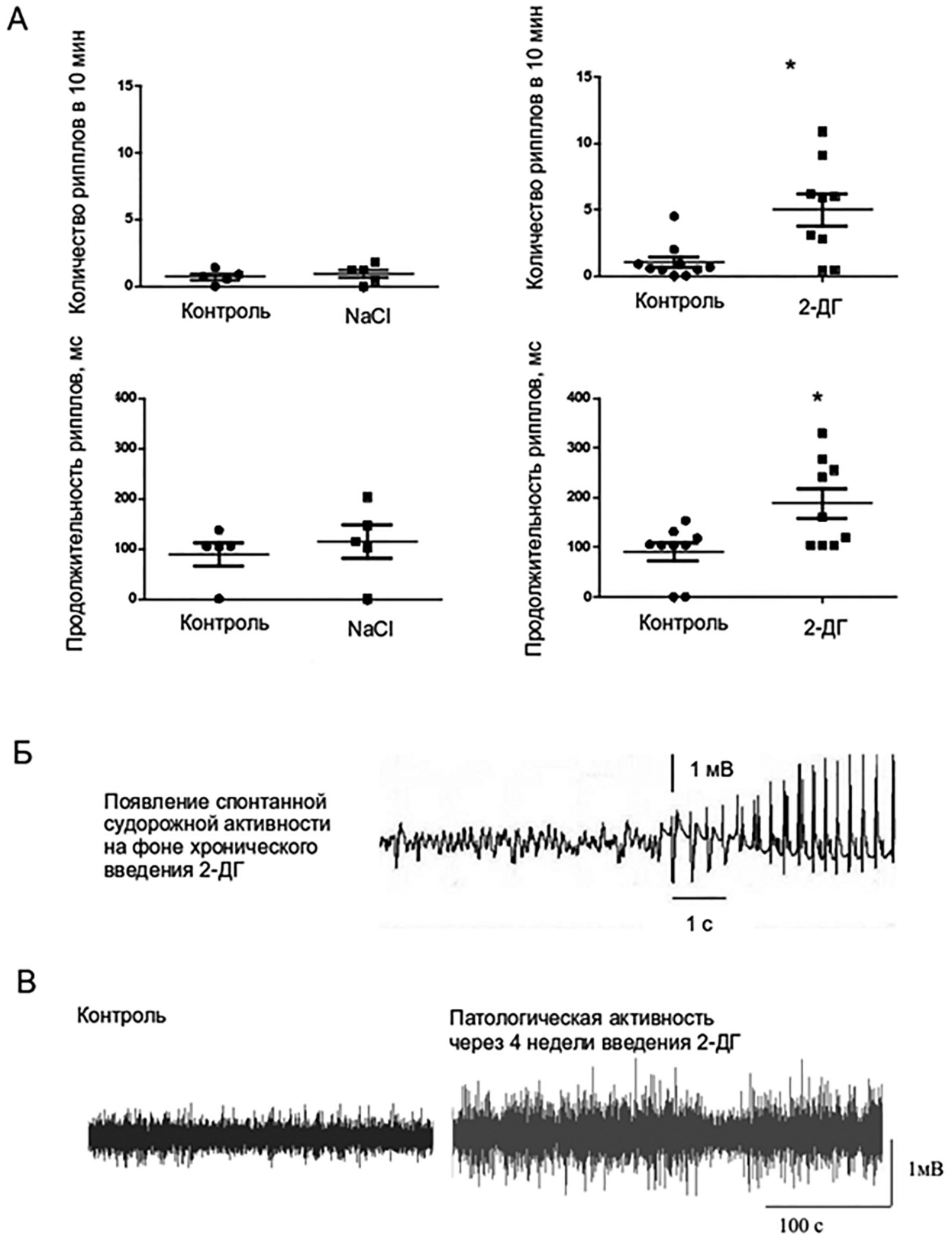


Рис. 2. А. Статистика возникновения рипплов в контроле и после введения физиологического раствора (слева) и в контроле и после введения 2-ДГ (справа). Б. Пример судорожной активности в СПП у животного после хронического введения 2-ДГ. В. Представлена запись СПП у крысы в гиппокампе до начала и через 4 недели после ежедневного введения 2-ДГ в желудочки мозга

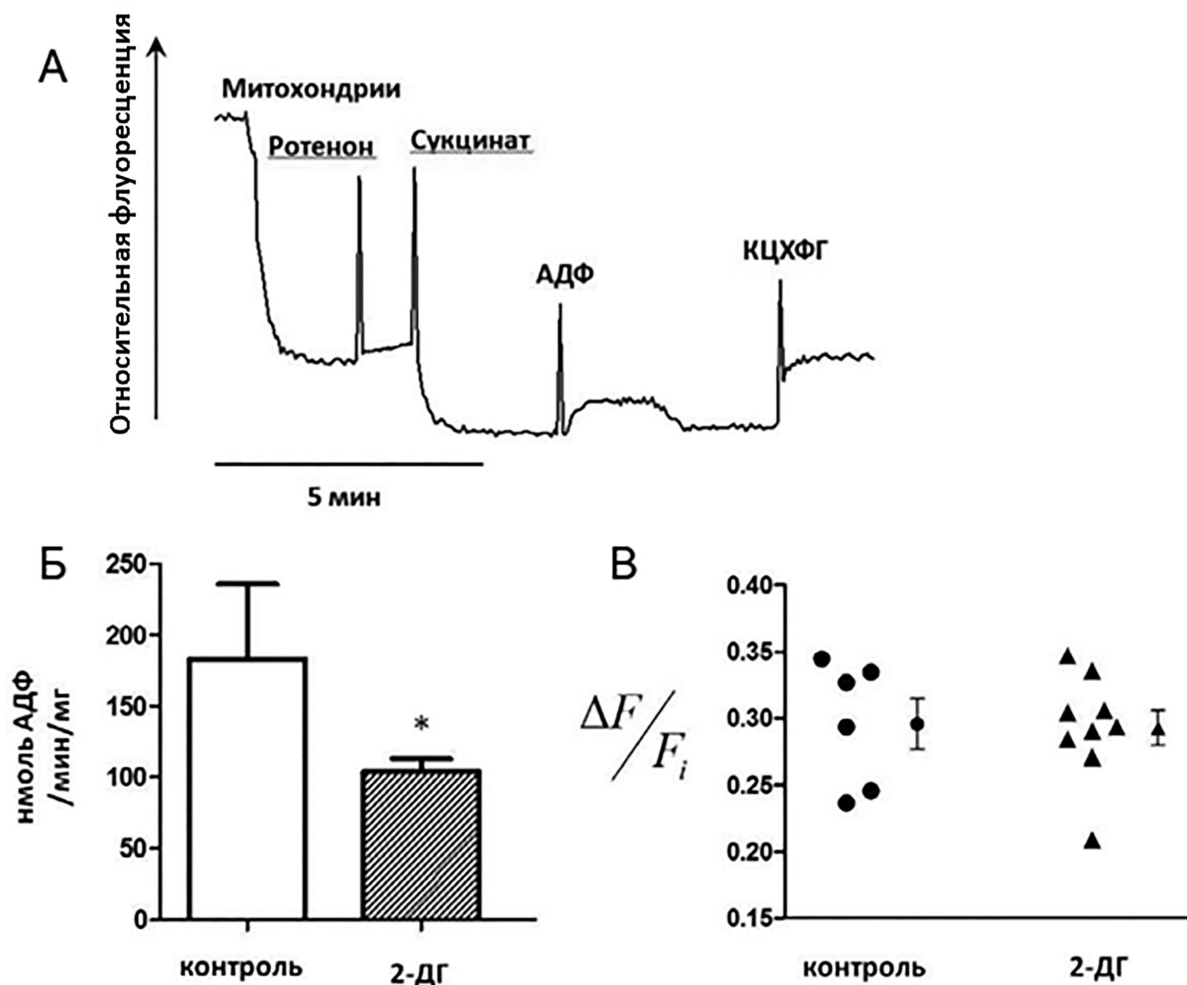


Рис. 3. А. Пример изменения флуоресценции родамина-123 в суспензии митохондрий мозга крысы. По оси ординат отложены единицы флуоресценции. Б. Скорость окислительного фосфорилирования митохондрий мозга крыс в нмоль АТФ в мин. на мг белка митохондрий. В. Оценка мембранного потенциала митохондрий головного мозга крыс, где ΔF рассчитывается как разница сигнала флуоресценции родамина-123 в суспензии митохондрий с максимальным потенциалом (уровень флуоресценции после добавки сукцината) и минимальным потенциалом (после добавления КЦХФГ), F_i — уровень флуоресценции после добавления сукцината

Таблица 2

Относительные изменения концентрации метаболитов в мозгу при энергодефиците по сравнению с контролем

Метаболит	$\Delta C, \%$
Холин	150%*
Сукцинат	-75%*
ГАМК	184%**
Аденозинфосфаты	-71%**
Гликоген	-75%*
Аденозин	205%*
Фумарат	138%*

Примечание: различия достоверны при * $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$ (U-критерий Манна – Уитни)

Заключение

В настоящей работе был разработан оригинальный методический подход (метаболический киндлинг) для выяснения вопроса, может ли локальный хронический энергодефицит инициировать патологический процесс. Полученные данные подтверждают предположение о том, что недостаточная утилизация глюкозы в мозгу может являться триггерным механизмом при формировании эпилептиформной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства инвестиций и инноваций Московской области (№14-44-03682, №15-34-20871 мол_a_вед).

Литература

1. *Bachelard H.S., Clark A.G., Thompson M.F.* Cerebral-cortex hexokinase. Elucidation of reaction mechanisms by substrate and dead-end inhibitor kinetic analysis // *Biochem. J.* — 1971. — Vol. 123(5). — P. 707–715.
2. *Bidder T.G.* Hexose translocation across the blood-brain interface: configurational aspects // *J. Neurochem.* — 1968. — Vol. 15(8). — P. 867–874.
3. *Bindoff L.A. & Engelsen B.A.* Mitochondrial diseases and epilepsy // *Epilepsia.* — 2012. — Vol. 53(Suppl. 4). — P. 92–97.
4. *Borg M.A., Borg W.P., Tamborlane W.V., Brines M.L., Shulman G.I., Sherwin R.S.* Chronic hypoglycemia and diabetes impair counterregulation induced by localized 2-deoxyglucose perfusion of the ventromedial hypothalamus in rats // *Diabetes.* — 1999. — Vol. 48(3). — P. 584–587.
5. *Brown J.* Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat // *Metabolism.* — 1962. — Vol. 11. — P. 1098–1112.
6. *Cortelli P., Perani D., Montagna P., Gallassi R., Tinuper P., Provini F., Avoni P., Ferrillo F., Anchisi D., Moresco R.M., Fazio F., Parchi P., Baruzzi A., Lugaresi E., Gambetti P.* Pre-symptomatic diagnosis in fatal familial insomnia: serial neurophysiological and 18FDG-PET studies // *Brain.* — 2006. — Vol. 129(Pt. 3). — P. 668–675.
7. *Crane R.K., Sols A.* The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds // *J. Biol. Chem.* — 1954. — Vol. 210(2). — P. 597–606.
8. *Daulatzai M.A.* Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease // *J. Neurosci. Res.* — 2016 [Epub ahead of print].
9. *Emaus R.K., Grunwald R., Lemasters J.J.* Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1986. — Vol. 850. — P. 436–448.
10. *Fischer W., Kittner H.* Influence of ethanol on the pentylene-tetrazol-induced kindling in rats // *J. Neural Transm.* — 1998. — Vol. 105(10–12). — P. 1129–1142.
11. *Jeon S.Y., Yi D., Byun M.S., Choi H.J., Kim H.J., Lee J.H., Baek H., Choe Y.M., Lee Y., Woo J.I., Lee D.Y.* Differential patterns of regional cerebral hypometabolism according to the level of cerebral amyloid deposition in patients with amnesic mild cognitive impairment // *Neurosci. Lett.* — 2016. — Vol. 632. — P. 104–108.
12. *Jupp B., Williams J., Binns D., Hicks R.J., Cardamone L., Jones N., Rees S., O'Brien T.J.* Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE // *Epilepsia.* — 2012. — Vol. 53(7). — P. 1233–1244.
13. *King L.J., Lowry O.H., Passonneau J.V., Venson V.* Effects of convulsants on energy reserves in the cerebral cortex // *J. Neurochem.* — 1967. — Vol. 14. — P. 599–611.
14. *Kudin A.P., Zsurka G., Elger C.E., Kunz W.S.* Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy // *Exp. Neurol.* — 2009. — Vol. 218(2). — P. 326–332.
15. *Kunz W.S., Kudin A.P., Vielhaber S., Blümcke I., Zschatter W., Schramm J., Beck H., Elger C.E.* Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy // *Ann. Neurol.* — 2000. — Vol. 48. — P. 766–773.
16. *Kunz W.S.* The role of mitochondria in epileptogenesis // *Curr. Opin. Neurol.* — 2016. — Vol. 15. — P. 179–184.
17. *Lee E.M., Park G.Y., Im K.C., Kim S.T., Woo C.W., Chung J.H., Kim K.S., Kim J.S., Shon Y.M., Kim Y.I., Kang J.K.* Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy // *Epilepsia.* — 2012. — Vol. 53(5). — P. 860–869.
18. *Maus M., Torrens Y., Gauchy C., Bretin S., Nairn A.C., Glowinski J., Premont J.* 2-Deoxyglucose and NMDA inhibit protein synthesis in neurons and regulate phosphorylation of elongation factor-2 by distinct mechanisms // *J. Neurochem.* — 2006. — Vol. 96(3). — P. 815–824.
19. *Oldendorf W.H.* Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection // *Am. J. Physiol.* — 1971. — Vol. 221(6). — P. 1629–1639.
20. *Pan J.W., Williamson A., Cavus I., Hetherington H.P., Zaveri H., Petroff O.A., Spencer D.D.* Neurometabolism in human epilepsy // *Epilepsia.* — 2008. — Vol. 49(Suppl. 3). — P. 31–41.
21. *Paxinos G. & Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. — San Diego Academic Press, 1998. — 237 p.
22. *Sacktor B., Wilson J.E., Tiekert C.G.* Regulation of glycolysis in brain, in situ, during convulsions // *J. Biol. Chem.* — 1966. — Vol. 241. — P. 5071–5075.
23. *Scaduto R.C., Jr., Grotyohann L.W.* Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives // *Biophys. J.* — 1999. — Vol. 76. — P. 469–477.
24. *Stafstrom C.E., Ockuly J.C., Murphree L., Valley M.T., Roopra A., Sutula T.P.* Anticonvulsant and antiepileptic actions of 2-deoxy-D-glucose in epilepsy models // *Ann. Neurol.* — 2009. — Vol. 65(4). — P. 435–447.
25. *Stanojlović M., Guševac I., Grković I., Mitrović N., Zlatković J., Horvat A., Drakulić D.* Repeated estradiol treatment attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rat hippocampus // *Cell Mol. Neurobiol.* — 2016. — Vol. 36(6). — P. 989–999.
26. *Wick A.N., Drury D.R., Morita T.N.* 2-Deoxyglucose: a metabolic block for glucose // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1955. — Vol. 89(4). — P. 579–582.

CHRONIC GLUCOSE HYPOMETABOLISM MODEL IN THE BRAIN OF EXPERIMENTAL ANIMALS

E.I. SAMOKHINA¹, I.E. MYSIN¹, A.A. OSYPOV^{2,3}, A.E. MALKOV¹,
S.I. PASKEVICH¹, M.V. MOLCHANOV¹, I.Yu. POPOVA¹

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino;*

² *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow;*

³ *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region*

We developed a method of chronic brain glucose hypometabolism induction by chronic intracerebroventricular administration of 2-deoxy-D-glucose (2-DG, non-metabolizable glucose analog). It has been shown that marked pathological changes in the brain electrical activity (epileptic activity) and biochemical parameters manifest after one month of daily administration of 2-DG. These results are the first evidence that a lack of glucose utilization in the brain might be a triggering mechanism initiating neuropathology. The proposed model can be used for researches of glucose hypometabolism contribution to the pathogenesis of neurodegenerative diseases and for development of compensatory treatment.

Keywords: brain, neuropathology, glucose hypometabolism, total field potentials, NMR, mitochondria, 2-deoxy-D-glucose.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ T7 РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ С ПОЗДНИМИ ПРОМОТОРАМИ T7 ДНК

А.А. СОРОКИН, Т.Р. ДЖЕЛЯДИН*, М.А. ОРЛОВ, Е.А. ЗЫКОВА, С.Г. КАМЗОЛОВА

Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл.

Пространственное распределение электростатического потенциала вокруг макромолекул оказывает заметное влияние на характер их взаимодействий. Нами рассмотрено распределение электростатического потенциала вокруг РНК-полимеразы фага T7 и взаимодействующих с этим белком промоторов. Известно, что промоторы фага T7 могут быть разбиты на несколько классов, отличающихся, в том числе, по характеру распределения электростатического потенциала. Показано, что промотор-связывающий домен белка формирует три четко выраженных положительных хребта, геометрия которых согласуется с особенностями распределения электростатического потенциала вокруг промоторной ДНК различных классов промоторов.

Ключевые слова: T7 ДНК, поздние промоторы, T7 РНК полимеразы, электростатические взаимодействия, распознавание.

Введение

ДНК-связывающие белки ответственны за реализацию таких ключевых биологических функций в жизни клетки, как репликация, рекомбинация и транскрипция. ДНК-белковое узнавание, направленное на идентификацию и локализацию индивидуальным белком специфической нуклеотидной последовательности в геномной ДНК, является сложным многостадийным процессом, в котором могут участвовать разные уровни структурной организации взаимодействующих макромолекул и их физико-химические свойства.

Первоначально и довольно длительное время основное внимание в исследовании механизмов ДНК-белкового узнавания было направлено на определение нуклеотидной последовательности специфических участков-мишеней ДНК, с которыми взаимодействует конкретный белок. К настоящему времени эта задача решена практически для всех известных взаимодействующих с ДНК белков и не представляет большой трудности в отношении новых белков.

Нужно отметить, что в ходе этих исследований выяснилось, что некоторые ДНК-связывающие белки способны распознавать множество участков ДНК с довольно вариабельным нуклеотидным составом. Так, в случае узнавания РНК-полимеразой промоторных участков в ДНК вариабельность нуклеотидной последовательности промоторов является необходимым фактором для эффективного функционирования промоторно-полимеразных комплексов в соответствии с состоянием клеточного метаболизма и условиями внешней среды. Более того, было показано, что для ряда промоторов, нативных для РНК-полимеразы *E. coli*, взаимодействие с ферментом определяется в большей степени не нуклеотидной последовательностью, а их физическими свойствами [15, 27]. В частности, ранние промоторы ДНК фага T4, имеющие совершенно идентичную нуклеотидную последовательность, с разной эффективностью взаимодействуют с РНК-полимеразой *E. coli*, а также отличаются по функциональному ответу на один и тот же внешний сигнал. Оказалось, что функционально значимой детерминантой, определяющей в этом случае характер и эффективность взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами, является электростатический профиль промоторной ДНК [1, 15, 27].

Хотя для каждого взаимодействующего с ДНК белка конечной и очень важной стадией является связывание этого белка с конкретной нуклеотидной последовательностью и образование с ней функционально компетентного комплекса, однако не менее важным в

© 2016 г. Сорокин А.А., Дзелядин Т.Р., Орлов М.А., Зыкова Е.А., Камзолова С.Г.

* Автор для переписки:

Дзелядин Тимур Рустемович

к.ф.-м.н., ст.н.с., ИБК РАН

142290 Пущино, ул. Институтская, 3

E-mail: dzhelyadin@gmail.com

процессе узнавания представляются стадии поиска и идентификации белком этих специфических последовательностей ДНК.

В настоящее время известно, что информация, узнаваемая ДНК-связывающими белками в процессе поиска и идентификации своих участков-мишеней, кодируется в таких физико-химических и структурных характеристиках молекулы ДНК, как электростатический потенциал [1, 15, 16, 21, 25, 27, 29], термодинамическая стабильность двойной спирали и наличие однонитевых участков [18, 31], устойчивость к дестабилизации посредством суперскрученности [30], гибкость [24], способность формировать изломы [12], а также локальные изменения в геометрии малых бороздок двойной спирали [25, 26].

Из всех перечисленных свойств только электростатический потенциал ДНК может узнаваться белком на расстоянии на самых ранних этапах распознавания, начиная со стадии диффузии вдоль молекулы ДНК и до возникновения первых межмолекулярных контактов. Особое значение электростатические взаимодействия имеют для правильной ориентации белка в отношении участка ДНК-мишени с тем, чтобы облегчить формирование оптимального пространственного расположения доноров и акцепторов водородной связи в бороздках двойной спирали специфической нуклеотидной последовательности и обеспечить наиболее рациональное образование продуктивного ДНК-белкового комплекса [14, 29].

Значимость электростатических сил при ДНК-белковом узнавании подтверждает недавно обнаруженное явление ДНК-мимикрии белками, которое заключается в том, что некоторые белки-миметики могут имитировать на своей поверхности сходное с ДНК-мишенями распределение электростатического потенциала, конкурируя при этом с ДНК за связывание с активными сайтами соответствующих ДНК-связывающих белков [28].

Таким образом, электростатические взаимодействия макромолекул являются необходимым и очень важным этапом в ДНК-белковом узнавании. Выяснение характера этих взаимодействий и их вклада в суммарный процесс узнавания служит предметом исследования для каждой конкретной ДНК-белковой пары.

В данной работе изучен характер электростатических взаимодействий Т7 фагоспецифичной РНК-полимеразы с ее нативными промоторами Т7 ДНК. Отличительной особенностью работы является исследование пространственной организации распределения электростатического потенциала комплексов Т7-РНК-полимеразы с Т7 поздними промоторами разных клас-

сов и анализ связи электростатических характеристик комплексов с их функциональным поведением.

Материалы и методы

Структура РНК-полимеразы Т7, представляющая собой структуру полного белка, включая 8 аминокислот в N-терминальной области, которые обычно неразличимы в кристаллических структурах этого белка, была получена с помощью сервера SwissModel моделированием последовательности UniProt ID P00573. С полученной предварительной трехмерной структурой был затем проведен отжиг длительностью 5 нс при температуре 300К в водном растворе 100 мМ соли, используя силовое поле OPLS [13] в программе GROMOS [11]. Распределение электростатического поля вокруг белковой глобулы было вычислено с использованием программы APBS [4] при 300К, нейтральном рН и 100 мМ одновалентной соли.

Электростатический потенциал вокруг ДНК был вычислен на поверхности цилиндра радиуса 15Å, коаксиального двойной спирали, с использованием закона Кулона [22]. Полноатомная модель двойной спирали ДНК была получена с использованием структуры нуклеотидной пары из работы [2] и зарядов атомов из работы [33]. Параметры геометрии спирали для конкретной последовательности были вычислены в соответствии с алгоритмом, представленным в исследовании [3]. Для того чтобы ось спирали ДНК оставалась прямолинейной, варьировали только параметры rise и twist динуклеотидного шага [7], величины которых были взяты из работы [23].

Результаты и обсуждение

Характеристика и классификация поздних промоторов Т7 ДНК, узнаваемых Т7 фагоспецифичной РНК-полимеразой

Т7 ДНК, содержащая 39936 пар нуклеотидов, транскрибируется двумя разными РНК-полимеразами. В первые 6 минут после инфекции хозяйская РНК-полимераза *E. coli* ($E\sigma^{70}$) считывает информацию с ранней области фагового генома, которая составляет 20% Т7 ДНК с левого конца. Основным продуктом экспрессии ранних генов Т7 ДНК является Т7 фагоспецифичная РНК-полимераза, которая осуществляет синтез РНК с остальной части фагового генома. Эта часть Т7 генома включает в себя поздние гены, которые по своим свойствам, локализации в геноме, времени экспрессии, физиологическому поведению и биохимическим

характеристикам могут быть четко разделены на 2 класса (гены классов II и III) [9]. Нужно подчеркнуть, что гены, относящиеся к одному и тому же классу, ведут себя как компактная группа генов со сходным поведением. Компактные группы генов II и III классов расположены друг за другом слева направо в поздней области Т7 ДНК и экспрессируются последовательно в два перекрывающихся по времени этапа с разницей в несколько минут.

Экспрессия этих генов контролируется 12 поздними промоторами, которые утилизируются Т7 РНК-полимеразой. Поздние промоторы Т7 ДНК могут быть также классифицированы в соответствии с категорией соответствующих генов (промоторы класса II и III). Классификация Т7 поздних промоторов, узнаваемых Т7 РНК-полимеразой, и их характеристика представлены в таблице 1.

Таблица 1

Промоторы, контролирующие экспрессию поздних генов Т7 ДНК

Промотор	Позиция ТСТ (п.о.)	Время экспрессии	Функция	Нуклеотидная последовательность
Консенсусная последовательность				-17 <u>taatac</u> <u>gactcactata</u> Gggaga +6
Промоторы класса II				
φ 1.5	7778	6–15 мин. после инфицирования	Регуляция генов, кодирующих ферменты метаболизма фаговой ДНК	ttaactgg <u>taatac</u> <u>gactcactaaa</u> Ggaggt acac
φ 1.6	7895			gtcacgct <u>taatac</u> <u>gactcactaaa</u> Ggagac acta
φ 2.5	9107			caccgaag <u>taatac</u> <u>gactcactatt</u> Agggaa gact
φ 3.8	11180			tggataat <u>taattga</u> <u>actcactaaa</u> Gggaga ccac
φ 4c	12671			gactgaga <u>caatccg</u> <u>actcactaaa</u> Gagaga gatt
φ 4.3	13341			tcccattc <u>taatac</u> <u>gactcactaaa</u> Ggagac acac
φ 4.7	13915			catgaata <u>ctattcg</u> <u>actcactata</u> Ggagat atta
Промоторы класса III				
φ 6.5	18545	8 мин. после инфицирования и до распада клетки	Регуляция генов структурных белков фага	ccctaaat <u>taatac</u> <u>gactcactata</u> Gggaga tagg
φ 9	21865			cgggaatt <u>taatac</u> <u>gactcactata</u> Gggaga cctc
φ 10	22904			ttcgaat <u>taatac</u> <u>gactcactata</u> Gggaga ccac
φ 13	27274			ctcgaat <u>taatac</u> <u>gactcactata</u> Gggaga acaa
φ 17	34566			gtaggaaa <u>taatac</u> <u>gactcactata</u> Gggaga ggcg

Примечание: Промоторы Т7 бактериофага, узнаваемые Т7 РНК-полимеразой. Указана 23-членная консенсусная последовательность. В промоторах эта последовательность отделена пробелами; точка старта транскрипции ТСТ обозначена заглавной буквой; нуклеотиды, идентичные для всех промоторов, подчеркнуты. Классификация проведена в соответствии с данными [9]

Все 12 промоторов функционально и биохимически хорошо охарактеризованы *in vivo* и *in vitro* [9, 19, 20]. Обобщая известные данные, нужно отметить, что промоторы двух классов отличаются друг от друга практически по всем исследованным характеристикам: по промоторной силе, по эффективности взаимодействия их с Т7 РНК-полимеразой, по условиям образования продуктивных промоторно-полимеразных комплексов и их устойчивости к денатурирующим воздействиям [19, 20]. Все это свидетельствует о разном характере

взаимодействия Т7 РНК-полимеразы с промоторами разных классов.

Механизмы, с помощью которых Т7 РНК-полимераза может дифференцировать промоторные классы и регулировать их активность, все еще не вполне понятны. В поисках дискриминирующих факторов, позволяющих РНК-полимеразе избирательно идентифицировать промоторы разных классов, проведен анализ структуры и физических свойств промоторных ДНК.

Анализ нуклеотидной последовательности промоторов обоих классов выявил высококонсервативную 23-членную консенсусную последовательность, расположенную в районе +6п.о. -17п.о. (см. табл.1). Все промоторы III класса имеют идентичную консенсусную последовательность. Последовательности промоторов II класса отличаются от консенсусной 1–7 нуклеотидами в разных промоторах. Интересно, что отличие в нуклеотидной последовательности в некоторых случаях меньше для промоторов разных групп, чем для промоторов внутри одной (II) группы. В то же время функциональное поведение промоторов определяется их принадлежностью к классу.

Еще одной отличительной особенностью нуклеотидной последовательности T7 поздних промоторов является наличие в районе -23 -13п.о. АТ-богатого участка, содержащего непрерывную АТ-последовательность без вставок. Как известно, присутствие АТ-богатого участка может оказывать влияние на физические свойства ДНК и самого участка, и близлежащей области. В частности, АТ-богатые последовательности относятся к наиболее легкоплавким участкам двойной спирали ДНК, которые известны как предпочтительные сайты для РНК-полимеразы [20]. Участки ДНК, содержащие короткие олиго А-последовательности, обладают повышенной гибкостью и рассматриваются как важный фактор, участвующий в узнавании промоторов РНК-полимеразой [24]. Кроме того, наличие (АТ)_n-участка в промоторной ДНК может влиять на ее электростатические свойства и вносить вклад в функциональную активность промоторов [1]. При этом нужно отметить, что нуклеотидные замены в последовательности промотора влияют на электростатические свойства промоторной ДНК, внося изменения в электростатический профиль не только локально в точке самой нуклеотидной замены, но и затрагивая другие достаточно далекие участки промоторной последовательности, включая узнающие промоторные элементы (эффект дальнего действия) [1].

Таким образом, проведенный анализ указывает на возможность формирования в T7 промоторной ДНК специфических физических характеристик, функционально значимых для взаимодействия с РНК-полимеразой. Как и для пары: промоторы T4 ДНК – РНК-полимераза *E. coli* [15], и в данном случае наиболее перспективным дискриминирующим фактором, позволяющим T7 РНК-полимеразе избирательно идентифицировать промоторы разных классов, может

быть различие в характере электростатических взаимодействий фермента с промоторной ДНК [14]. Очень важно, что для данной пары вследствие небольших размеров взаимодействующих молекул возможно изучение пространственной организации распределения электростатического потенциала вокруг каждой из компонент и анализ пространственного соответствия их узнающих элементов в комплексе. Пока еще немногочисленные работы по исследованию пространственного аспекта межмолекулярных взаимодействий продемонстрировали необходимость и перспективность этого направления в выяснении механизмов ДНК-белкового узнавания [8].

Электростатические свойства промотор-связывающего центра РНК-полимеразы T7

T7 РНК-полимераза представляет собой небольшой мономерный белок длиной в 883 а.к. Известна кристаллическая 3D структура как самого белка, так и ряда его комплексов с ДНК и лигандами на различных этапах процесса транскрипции [5, 6, 10, 17, 32]. Анализ комплекса T7 РНК-полимеразы с промоторной ДНК показывает, что в промоторном узнавании участвуют два фрагмента белка: промотор-связывающая область (РВД) и петля, специфически распознающая консенсусную последовательность T7 промоторов (specificity loop, SL). Как показано на рисунке 1А, РВД состоит из 6 α -спиралей, окружающих участок SL, образуя узнающий центр фермента. На рисунке 1Б представлено распределение электростатического потенциала вокруг этой части белка и схематически показано положение промоторной ДНК в узнающем центре. Видно, что в распределении электростатического потенциала выделяются три положительно заряженных хребта (Crest A, Crest B и Crest C), соответствующих трем субъединицам белка, участвующим во взаимодействии с тремя функционально значимыми участками промотора: два субдомена РВД взаимодействуют с АТ-богатым участком промотора в районе -17 п.о. и областью вокруг точки старта транскрипции (хребты А и С, соответственно); субдомен SL (хребет В) отвечает за распознавание дискриминирующей последовательности T7 промотора в области -9 п.о. Нужно отметить, что расстояние между хребтами находится в диапазоне 19–20Å (рис. 1D), что соответствует половине витка спирали ДНК и способствует оптимальному расположению узнающих участков промоторной ДНК и элементов белка в пространстве. Положительно заряженная долина между хребтами А и В способствует оптимальному размещению сахаро-фосфатного остова нематричной цепи.

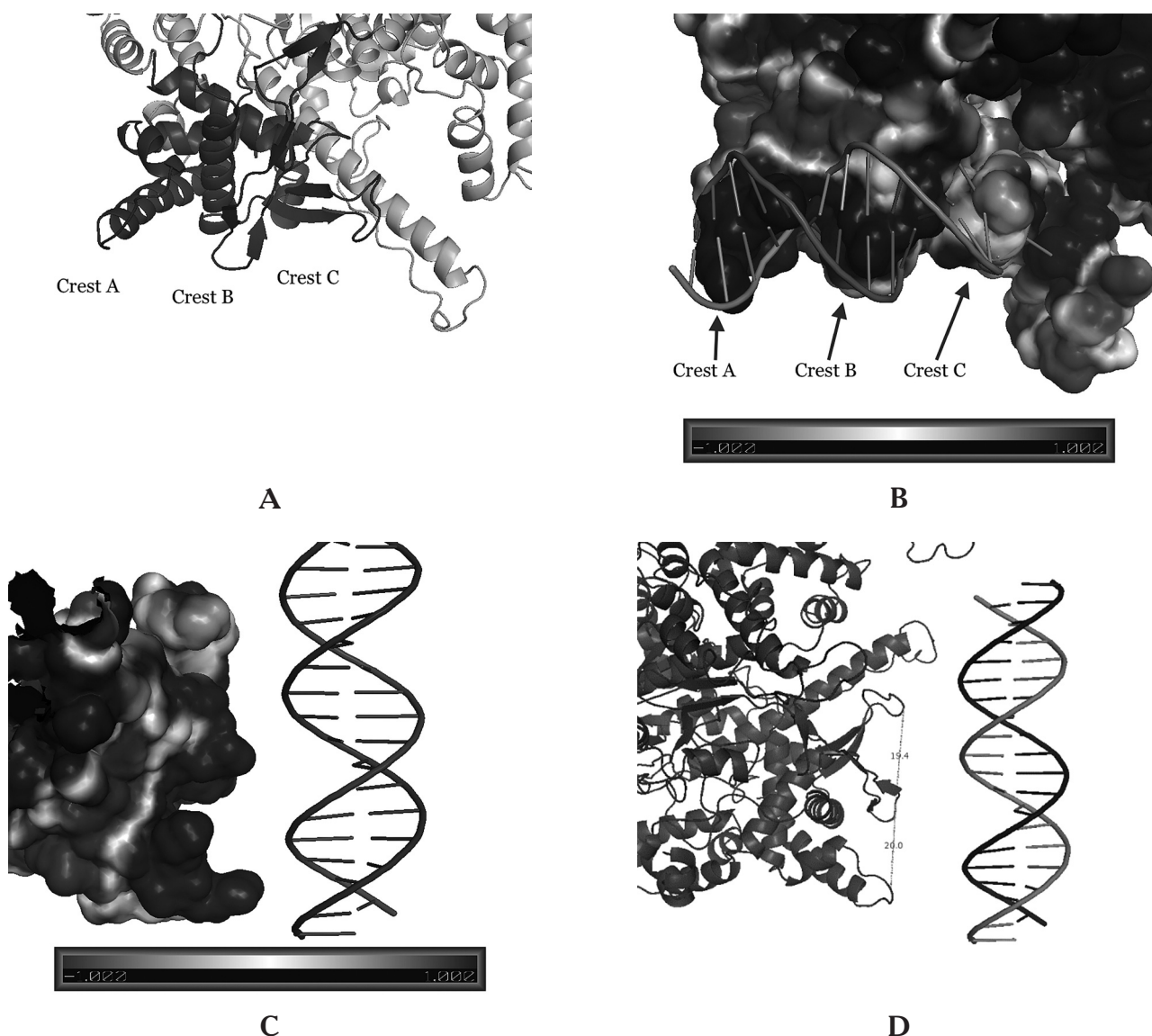


Рис. 1. Структура и распределение электростатического потенциала вокруг промотор-связывающего центра (РВД) РНК-полимеразы Т7 (цветная версия доступна на сайте promodel.icb.psn.ru). А) Структура РНК-полимеразы в области РВД: Crest А – остатки 72–150, темные спирали в Crest В и Crest С – остатки 191–267, светлая петля в Crest В – остатки 739–770 (specificity loop, специфически распознающая консенсусную последовательность Т7 промоторов петля); В) распределение электростатического потенциала вокруг РВД РНК-полимеразы Т7. Стрелками отмечены положительные хребты, сформированные доменами, показанными на панели А; положение промоторной ДНК показано в соответствии с кристаллической структурой 1cez РДВ. С) Вид сбоку на домены, показанные на панели В, модель ДНК расположена так, что цилиндр радиуса 15Å, соосный оси спирали, касается поверхности белка. D) структура РВД РНК-полимеразы Т7, представленной на панели С. Показаны расстояния между пиками хребтов

Электростатические свойства Т7-специфических промоторов

Особенности распределения электростатического потенциала в промотор-узнающем центре РНК-полимеразы Т7 свидетельствуют о том, что фрагменты ДНК, участвующие во взаимодействии с этим центром, должны также иметь особенности в распределении электростатического потенциала, комплементарные характерному профилю белка. Для исследования этой

гипотезы мы рассмотрим профили потенциала вокруг фрагментов ДНК, содержащих промоторы классов II и III бактериофага Т7. Электростатический потенциал был вычислен на поверхности цилиндров радиуса 15Å, соосных 12 фрагментам ДНК, содержащим поздние промоторы фага Т7 (см. табл. 1), и представлен в виде двумерной карты на рисунке 2, где по оси X отложено расстояние от точки старта транскрипции вдоль оси спирали ДНК, а по оси Y – азимутальный угол. Для

каждой карты на этом рисунке приведен также одномерный профиль, соответствующий величине потенциала, усредненной по азимутальному углу. Репрезентативные карты для промоторов класса II (промотор $\varphi 4.3$) и III

(промотор $\varphi 13$) представлены на рисунках 2А и 2В, соответственно. Для каждого класса был также вычислен консенсусный профиль (рис. 2С и 2D), усредненный по всем промоторам данного класса.

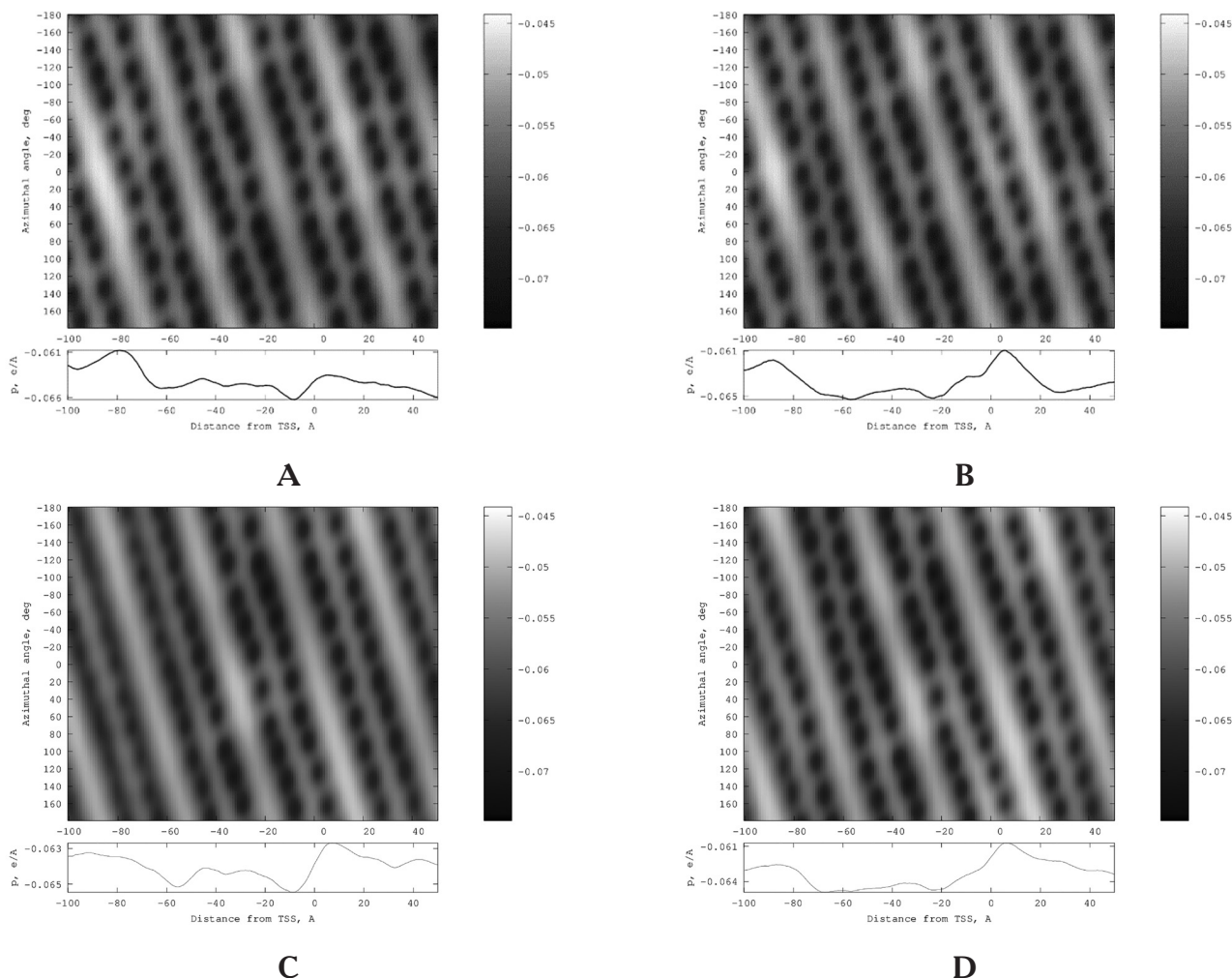


Рис. 2. Распределение электростатического потенциала вокруг нативных промоторов фага T7 (цветная версия доступна на сайте promodel.icb.psn.ru). Двумерная карта представляет величину потенциала на поверхности цилиндра, соосного ДНК в псевдоцветах, для каждой карты показан усредненный по азимутальному углу одномерный профиль. А) потенциал промотора $\varphi 4.3$, характерного представителя класса II; В) потенциал промотора $\varphi 13$, характерного представителя класса III; С) усредненная «консенсусная» карта потенциала для промоторов класса II; D) усредненная «консенсусная» карта потенциала для промоторов класса II

Поверхность цилиндра, на которой вычислялось значение потенциала, находится на расстоянии 5\AA от наиболее отрицательно заряженных атомов кислорода в фосфатных группах сахаро-фосфатного остова ДНК. Наиболее темные отрицательные области на карте соответствуют положению остова двойной спирали, а светлые области — большой и малой бороздам ДНК. Можно заметить, что зауженная малая борозда имеет потенциал, слабо отличающийся по величине от потенциала остова (например, потенциал промотора $\varphi 13$ в районе -60\AA и

140 градусов на рис. 2В). С другой стороны, в областях широких малых борозд на одномерном профиле электростатический потенциал выше, чем в областях зауженных малых борозд (сравните профиль потенциала промотора $\varphi 4.3$ в районе $+20\text{\AA}$ и -60\AA на рис. 2А).

Важно отметить, что каждый класс промоторов имеет свои характерные особенности в распределении потенциала, что имеет значение для дифференциального распознавания промоторов разными функционально значимыми участками фермента (Crest A, Crest B и

Crest C рис. 1А, В). Так, у промоторов класса II (рис. 2С) потенциал в центре малой борозды в области -20\AA практически не отличим от потенциала остова, и такое распределение сохраняется до точки старта транскрипции. В то же время у промоторов класса III потенциал малой борозды в районе точки старта транскрипции практически равен потенциалу большой борозды.

Как известно, различие в величине потенциала может оказать влияние на взаимную ориентацию белка и ДНК при их первоначальном взаимодействии, что важно для прохождения последующих стадий комплексообразования. Поэтому разница в пространственной организации взаимодействующих электростатических потенциалов первоначальных комплексов, образованных разными промоторными классами с Т7 РНК полимеразой, может влиять на пути и скорости образования конечного функционально значимого комплекса фермента и ДНК. Это предлагает разумное объяснение различия в силе и функциональном поведении различных промоторов Т7 ДНК, принадлежащих разным классам.

Литература

1. Сорокин А.А. Функциональный анализ промоторных последовательностей *E. coli*. Канд. дисс., Пущино, ИТЭБ РАН, 2001. — 130 с.
2. Aoki K., Arnott S., Chandrasekaran R., Jeffrey G.A., Moras D., and Neidle S. Crystallographic and Structural Data II / Kristallographische und Strukturelle Daten II. — Springer, 1988.
3. Babcock M.S. and Olson W.K. The effect of mathematics and coordinate system on comparability and «dependencies» of nucleic acid structure parameters // J. Mol. Biol. — 1994. — Vol. 237. — No. 1. — P. 98–124.
4. Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J., and McCammon J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2001. — Vol. 98. — No. 18. — P. 10037–10041.
5. Cheetham G.M., Jeruzalmi D., and Steitz T.A. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex // Nature. — 1999. — Vol. 399. — No. 6731. — P. 80–83.
6. Cheetham G.M., Jeruzalmi D., and Steitz T.A. Transcription regulation, initiation, and «DNA scrunching» by T7 RNA polymerase // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. — 1998. — Vol. 63. — P. 263–267.
7. Dickerson R.E. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // J. Biomol. Struct. Dyn. — 1989. — Vol. 6. — No. 4. — P. 627–634.
8. Djordjevic M. Redefining *Escherichia coli* $\sigma(70)$ promoter elements: -15 motif as a complement of the -10 motif // J. Bacteriol. — 2011. — Vol. 193. — No. 22. — P. 6305–6314.
9. Dunn J.J., Studier F.W., and Gottesman M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements // J. Mol. Biol. — 1983. — Vol. 166. — No. 4. — P. 477–535.
10. Durniak K.J., Bailey S., and Steitz T.A. The structure of a transcribing T7 RNA polymerase in transition from initiation to elongation // Science. — 2008. — Vol. 322. — No. 5901. — P. 553–557.
11. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., and Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // J. Chem. Theory Comput. — 2008. — Vol. 4. — No. 3. — P. 435–447.
12. Jensen L.J., Friis C., and Ussery D.W. Three views of microbial genomes // Res. Microbiol. — 1999. — Vol. 150. — No. 9–10. — P. 773–777.
13. Jorgensen W.L. and Tirado-Rives J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin // J. Am. Chem. Soc. — 1988. — Vol. 110. — No. 6. — P. 1657–1666.
14. Kamzolova S.G., Beskaravainy P.M., Osypov A.A., Dzheilyadin T.R., Temlyakova E.A., and Sorokin A.A. Electrostatic map of T7 DNA: comparative analysis of functional and electrostatic properties of T7 RNA polymerase-specific promoters // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2014. — Vol. 32. — No. 8. — P. 1184–1192.
15. Kamzolova S.G., Sivozhelezov V.S., Sorokin A.A., Dzheilyadin T.R., Ivanova N.N., and Polozov R.V. RNA polymerase-promoter recognition. Specific features of electrostatic potential of «early» T4 phage DNA promoters // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2000. — Vol. 18. — No. 3. — P. 325–334.
16. Kamzolova S.G., Sorokin A.A., Dzheilyadin T.R., Beskaravainy P.M., and Osypov A.A. Electrostatic potentials of *E. coli* genome DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2005. — Vol. 23. — No. 3. — P. 341–346.
17. Kennedy W.P., Momand J.R., and Yin Y.W. Mechanism for de novo RNA synthesis and initiating nucleotide specificity by t7 RNA polymerase // J. Mol. Biol. — 2007. — Vol. 370. — No. 2. — P. 256–268.
18. Margalit H., Shapiro B.A., Nussinov R., Owens J., and Jernigan R.L. Helix stability in prokaryotic promoter regions // Biochemistry. — 1988. — Vol. 27. — No. 14. — P. 5179–5188.
19. McAllister W.T., Morris C., Rosenberg A.H., and Studier F.W. Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection // J. Mol. Biol. — 1981. — Vol. 153. — No. 3. — P. 527–544.
20. McAllister W.T. and Carter A.D. Regulation of promoter selection by the bacteriophage T7 RNA polymerase in vitro

- // Nucleic Acids Res. – 1980. – Vol. 8. – No. 20. – P. 4821–4837.
21. Osypov A.A., Krutinin G.G., and Kamzolova S.G. DEPPDB – DNA electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome DNA // J. Bioinform. Comput. Biol. – 2010. – Vol. 8. – No. 3. – P. 413–425.
22. Polozov R.V., Dzhelyadin T.R., Sorokin A.A., Ivanova N.N., Sivozhelezov V.S., and Kamzolova S.G. Electrostatic potentials of DNA. Comparative analysis of promoter and nonpromoter nucleotide sequences // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1999. – Vol. 16. – No. 6. – P. 1135–1143.
23. Ponomarenko M.P., Kolchanova A.N., and Kolchanov N.A. Generating programs for predicting the activity of functional sites // J. Comput. Biol. – 1997. – Vol. 4. – No. 1. – P. 83–90.
24. Pérez-Martín J., Rojo F., and de Lorenzo V. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression // Microbiol. Rev. – 1994. – Vol. 58. – No. 2. – P. 268–290.
25. Rohs R., West S.M., Liu P., and Honig B. Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2009. – Vol. 19. – No. 2. – P. 171–177.
26. Rohs R., West S.M., Sosinsky A., Liu P., Mann R.S., and Honig B. The role of DNA shape in protein-DNA recognition // Nature. – 2009. – Vol. 461. – No. 7268. – P. 1248–1253.
27. Sorokin A.A., Osypov A.A., Dzhelyadin T.R., Beskaraivainy P.M., and Kamzolova S.G. Electrostatic properties of promoter recognized by E. coli RNA polymerase Esigma70 // J. Bioinform. Comput. Biol. – 2006. – Vol. 4. – No. 2. – P. 455–467.
28. Tsonis P.A. and Dwivedi B. Molecular mimicry: structural camouflage of proteins and nucleic acids // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – Vol. 1783. – No. 2. – P. 177–187.
29. von Hippel P.H. Completing the view of transcriptional regulation // Science. – 2004. – Vol. 305. – No. 5682. – P. 350–352.
30. Wang H. and Benham C.J. Promoter prediction and annotation of microbial genomes based on DNA sequence and structural responses to superhelical stress // BMC Bioinformatics. – 2006. – Vol. 7. – P. 248.
31. Yeramian E. Genes and the physics of the DNA double-helix // Gene. – 2000. – 2000. – Vol. 255. – No. 2. – P. 139–150.
32. Yin Y.W. and Steitz T.A. The structural mechanism of translocation and helicase activity in T7 RNA polymerase // Cell. – 2004. – Vol. 116. – No. 3. – P. 393–404.
33. Zhurkin V.B., Poltev V.I., and Florent'ev V.L. Atom-atomic potential functions for conformational calculations of nucleic acids // Mol. Biol. (Mosk). – 1980. – Vol. 14. – No. 5. – P. 1116–1130.

THE SPATIAL ORGANIZATION OF THE ELECTROSTATIC INTERACTIONS OF THE T7 RNA POLYMERASE WITH T7 DNA LATE PROMOTERS

A.A. SOROKIN, T.R. DZHELYADIN, M.A. ORLOV, Ye.A. ZYKOVA, S.G. KAMZOLOVA

Institute of Cell Biophysics, Pushchino, Moscow region

Spatial distribution of electrostatic potential is known to play important role in interaction between macromolecules. We have analysed distribution of electrostatic potential around RNA-polymerase of phage T7 and T7 native promoters interacting with it. It is known that T7 native promoters could be divided into several classes, which differ in activity and physical properties including electrostatic profile. We have shown that promoter-binding domain of T7 RNA-polymerase forms three positively charged crests, which spatial position correlates with spatial distribution of electrostatic potential around promoter DNA.

Keywords: T7 DNA, late promoter, T7 RNA polymerase, electrostatic interactions, recognition.

РОЛЬ МИКРОБИОЛОГИИ В СОХРАНЕНИИ ПАМЯТНИКОВ ИСТОРИИ И КУЛЬТУРЫ В МУЗЕЯХ МОСКВЫ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю.А. ПЕТУШКОВА*, Ю.П. ПЕТУШКОВА

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Осуществили микробиологическое исследование микробиоты поврежденных музейных предметов и ограждающих конструкций, а также воздушной среды в экспозиционных залах и фондохранилищах в музеях Москвы и Московской области. Показана необходимость проведения биомониторинга в музейных помещениях для своевременного предотвращения биодеструкции материалов памятников истории и культуры и музейных коллекций.

Ключевые слова: микробиология, биоповреждение, памятники истории и культуры, музеи Московского региона, сохранение.

Введение

Большинство художественных ценностей, исторических памятников и произведений изобразительного искусства России хранится в многочисленных музеях. Музеи, в первую очередь, задумывались как средство защиты и содержания объектов культурного наследия. Поэтому особое место в музейном деле занимают вопросы хранения, включающие в себя создание таких условий, которые обеспечили бы долговременную сохранность музейных ценностей. Существует много попыток стандартизации условий содержания коллекций в музеях с целью лучшего их сохранения. Однако все экспонаты, особенно те из них, в состав которых входят вещества органического происхождения, подвержены постепенному изменению в процессе естественного старения. Остановить этот процесс нельзя, но можно его замедлить. Для этого необходимо обладать достаточными знаниями в области физических и химических свойств материалов экспонатов, знать условия, оптимальные для их нормального существования, и изучить причины их повреждения [9].

На сохранность музейных экспонатов негативное влияние оказывают суточные и сезонные колебания температуры и относительной влажности воздуха, загрязненный воздух, а также насекомые и микроорганизмы. Соответственно, проблемами сохранения произведений искусства занимаются специалисты в области музейной

климатологии, музейной микробиологии и музейной энтомологии. Физические и химические условия окружающей среды и состояние любого объекта культурного наследия определяют: продолжительность их существования и возможность биологического ускорения естественных физических процессов распада. Поэтому степень долговечности материалов не будет просто термодинамическим, связанным со временем процессом, но в значительной мере она будет зависеть от внешних и внутренних условий окружающей среды, благоприятствующих оптимальному развитию или воздействию биологических факторов.

Окружающая среда и климатические факторы, влияющие на микробиологическое повреждение. Для музеев установлены следующие оптимальные параметры: относительная влажность воздуха в пределах 50–55% и температура 18–20 °С, при которых развитие грибов может быть предотвращено. Однако такие условия не слишком подходят для посетителей, и их трудно поддерживать в присутствии слишком большого количества людей.

Вода играет основную роль во всех процессах превращения материалов, однако главная ее роль — это контроль и осуществление биологических процессов, которые без воды вообще не могли бы происходить. Климатические условия могут в значительной степени влиять на доступность воды во внутренних условиях окружающей среды. При относительной влажности воздуха, превышающей 55%, возможно развитие грибов, которые принимают участие в биоповреждении объектов, находящихся во внутренних условиях. Бактерии нуждаются в более высокой влажности для своего развития.

Как установлено химическими, биохимическими и биологическими экспериментами, скорость (био)химических процессов возрастает по мере повышения температуры до

© 2016 г. Петушкова Ю.А., Петушкова Ю.П.

* Автор для переписки:

Петушкова Юлия Алексеевна

к.б.н., ст.н.с. каф. биоинженерии Биологического факультета

МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: jupponline@gmail.com

определенного уровня. Таким образом, существует некоторый диапазон температур, в пределах которого метаболические процессы ускоряются, обычно — в пределах 20–38 °С, но это не означает, что ниже или выше этих величин биологическая активность полностью блокируется. Температурный диапазон, обеспечивающий выживаемость спор для многих микроорганизмов, весьма широк (от 0 до 110 °С).

Источники энергии и питательная среда. Если рассматривать уровни загрязнения атмосферы на протяжении всей истории, то можно с уверенностью утверждать, что процесс индустриализации в значительной мере усилил взаимодействия в системе объект — микроб — окружающая среда. Неорганические и органические загрязнители могут оказывать влияние на тип микрофлоры, обитающей на объекте, и стимулировать рост хемолитотрофных и/или хемоорганотрофных организмов, которые растут исключительно на неорганических или органических субстратах. Углеводы могут легко осажаться на каменных поверхностях и частично окисляются атмосферным кислородом или специфическими микроорганизмами. Образующийся в результате этих процессов углекислый газ (СО₂) обладает слабым растворяющим действием на карбонатные породы. Однако значительно более ярко выраженное биоразрушительное воздействие оказывают многие высокоактивные кислоты, образуемые бактериями в результате разложения углеводов и окисления восстановленных неорганических соединений.

Аэромикробиологический мониторинг воздуха в музейных помещениях. Одним из основных источников биозаражения музейных объектов является воздух, потоки которого перемещаются в разных направлениях и с разной скоростью. При определенных условиях спровоцированный рост микроорганизмов (бактерий и грибов) неминуем, что приводит к биоповреждениям находящихся в помещениях материалов и предметов, а также становится опасным для здоровья человека.

Состояние окружающей среды в помещениях музеев определяется в основном: низкими колебаниями микроклиматических факторов; поступлением атмосферных загрязнений (пылевых частиц, газов); температуры (суточными изменениями); заселением микроорганизмов; доступностью воды и питательных веществ для их жизнедеятельности (органические и неорганические субстраты, например, деревянные объекты, текстиль, станковая и настенная живопись, металлы, камень, штукатурка, архивные и библиотечные материалы, включая фотодокументы, бумагу, кожу, пергамент и т.д.) [4, 8].

В воздух помещений различные микроорганизмы могут попадать или снаружи, при проветривании, или из

каких-либо внутренних источников. В последнем случае микробиота бывает сравнительно однообразной, но может быть весьма многочисленной. Посетители также являются источником инфицирования воздуха в музеях. Важной составляющей исследований по диагностике и профилактике биоповреждений в музеях является изучение микробиоты воздуха. С одной стороны, это обусловлено тем, что значительная часть микроорганизмов, в том числе способная повреждать материалы, распространяется аэрогенным путем; с другой стороны, концентрация микроорганизмов в воздухе отражает общее санитарно-гигиеническое состояние помещений [5, 7].

Целью данной работы явилось обобщение результатов микробиологического исследования экспозиционных помещений, фондохранилищ и экспонатов в музеях Московского региона.

Материалы и методы

Методы отбора проб поврежденных материалов памятников, состав питательных сред для культивирования и количественного учета микроорганизмов в пробах подробно описаны ранее [4]. Идентификацию обнаруженных в пробах микромицетов и хемоорганотрофных бактерий, предварительно выделенных в чистые культуры, проводили, используя определители микроскопических грибов [1, 6] и бактерий [2, 3].

Аэромикробиологическое исследование помещений для определения количественного содержания микроорганизмов в воздушном пространстве проводилось импакционным осаждением проб аэрозолей на плотную питательную среду с помощью высокочувствительного электрического пробоотборного устройства ПУ-1Б [5].

Результаты и обсуждение

Типизация и особенности музейных объектов как потенциальной среды микробного развития. В статье рассматриваются конкретные примеры различных типов музейных объектов, которые были исследованы для проведения мероприятий по антисептированию, осуществленных на основании результатов анализа. В таблице 1 представлены исследуемые типы музейных объектов, отличающиеся, исходя из следующих критериев:

- возможности обеспечения и поддержания условий содержания (хранения);
- особенностей материала как субстрата для роста микроорганизмов-биодеструкторов.

Таблица 1

Типизация и особенности музейных объектов как потенциальной среды микробного развития

Типы музейных объектов	Субстратная специфичность микроорганизмов-деструкторов (материал)	Факторы, способствующие микробному росту		Особенности при создании оптимальных условий содержания/хранения	
		Перманентные (неизбежные)	Случайные (аварийные)	Меры по снижению вероятности микробного роста	Ограничения в связи с типом музейных объектов
Памятник архитектуры как здание музея-галереи	Деструкторы камня (кирпич, кладочный раствор, штукатурка, белый камень, дерево, облицовочные материалы)	Нарушение гидроизоляции и капиллярный подсос грунтовых вод в стены; внешние факторы окружающей среды	Сбой работы систем обеспечения температурно-влажностного режима (ТВР), локальные протечки	Введение централизованной системы вентиляции и кондиционирования; микробиологический анализ переувлажненных участков стен	В музеях режим хранения экспонатов часто не позволяет снизить влажность до уровня ниже оптимума для роста микроорганизмов
Памятник архитектуры как здание музея-усадьбы		Нарушение или отсутствие гидроизоляции, приводящее к высокому влажностному содержанию стен; поступление влаги вследствие сохранения старых элементов (конструкции кровли, окна и др.)	Протечки, возникающие с высокой частотой непредсказуемо в разных местах	Использование переносных бактерицидных ламп; установка локальных осушителей; микробиологический мониторинг воздушной среды	Конструктивное отсутствие возможности ведения централизованной системы вентиляции, кондиционирования и обеспечения стабильного температурно-влажностного режима
Скульптура под открытым небом	Деструкторы камня (мрамор, известняк, песчаник, гранит)	Воздействие внешних факторов (осадки, резкие колебания температуры, соли и другие соединения)	Изменения в структуре камня, обрастания биопленками приводят к усилению микробного роста	Помещение в закрытые стеклянные или деревянные «колпаки»	Изменение эстетического восприятия
Скульптура в интерьере музея		Отсутствуют	Заражение от других экспонатов	Избегать близкого примыкания к стенам музейного оборудования	Отсутствуют
Редкие книги	Деструкторы органических материалов (бумага, кожа, пергамент)	Ускоренное старение вследствие частого использования	Случайное заражение от соседних книг	Использование в стерильных перчатках и незараженных помещениях	Хранение книг разной степени сохранности по тематическому принципу
Предметы музейной археологии	Деструкторы камня, кости, керамики, кожи, текстиля, шерсти, дерева, красочного слоя и др.	Неизбежное старение, приводящее к образованию новых субстратов и расширению спектра потенциальных био-деструкторов	Изменение температурно-влажностного режима в помещении хранения; заражение от других экспонатов вследствие распространения спор микроорганизмов по воздуху	Создание оптимальных условий хранения; микробиологический анализ после проявления первых признаков биоповреждения и после сбоя в режиме хранения	При их совместном экспонировании невозможность создания единых оптимальных условий ТВР
Предметы декоративно-прикладного искусства				Выдерживание времени перед монтажом картин (карантин); микробиологический анализ новых поступлений	
Предметы изобразительного искусства				Отсутствие возможности частого отбора проб	

С учетом особенностей музейных условий, отраженных в таблице 1, становится неизбежной возможность реконтаминации музейных помещений и хранящихся в них предметов. В связи с этим с целью своевременного выявления возобновления микробного роста становится очевидной целесообразность проведения микробиологического мониторинга в музеях, результаты первого этапа которого отражены в настоящей статье.

Большинство музеев в России располагается не в специально построенных зданиях с экспонируемыми и хранящимися в них объектами культурного наследия, а в исторических зданиях, также являющихся объектами культурного наследия. Это представляет огромную ценность для посетителей, которые одновременно осматривают экспонаты и уникальные экспозиционные залы с сохранившимися интерьерами и приспособленными под музейные условия. Особенно это касается музеев-усадьб, комплексная концепция сохранения которых не позволяет не только отделять мемориальные предметы от самого архитектурного ансамбля, но и вносить существенные изменения в инженерной системе (включая систему вентиляции и кондиционирования) при проведении реставрации таких зданий.

В этой связи наличие неустраняемых перманентных факторов, которые вызывают высокую вероятность появления в музеях очагов развития микроорганизмов, в России, в частности, в Москве и Московской области, остается неизбежным. Более того, появление таких очагов в строительных конструкциях зданий музеев влечет за собой заражение хранящихся предметов из наиболее восприимчивых к биодеструкции органических материалов путем распространения спор грибов и бактерий по воздуху музейных помещений и, наоборот, внесение зараженного музейного предмета вызывает вероятность оседания распространяющихся спор на увлажненные стены.

Все это требует проведения комплексного микробиологического анализа, включающего в себя анализ строительных конструкций, воздушной среды помещений и музейных предметов с последующим комплексным микробиологическим мониторингом.

Следует отметить, что все функционирующие музеи Москвы и Московской области в той или иной степени отвечают требованиям сохранности, что касается и проблем биоповреждения. Тем не менее с проблемами микробного роста, обнаруживаемого на стенах и экспонатах, периодически сталкивается любой музей. Роль микробиологических исследований заключается в своевременном выявлении зон микробного развития на

начальных этапах и их подавления с применением тех методов, которые будут эффективными именно в отношении выявленных деструкторов с учетом их количественных показателей. Такой подход уменьшит вероятность возникновения новых очагов микробного роста даже при наличии перманентных факторов, благоприятствующих микробному росту.

Особенностью микробиологических исследований объектов культурного наследия является субстратспецифичность обнаруживаемых микроорганизмов, что отражено в таблице 1. Это учитывается при выделении биодеструкторов на селективные питательные среды, учитывающие химический состав анализируемого материала музейного объекта.

Микробиологические исследования стен музейных помещений. Основной проблемой создания оптимальных условий хранения является состояние самого памятника архитектуры, в котором находится музей.

В таблице 2 представлены результаты количественного микробиологического анализа стен пяти московских и подмосковных музеев. В выборку исследования попали различные примеры обоих типов архитектурных музейных объектов, галереи и музеи-усадьбы до реставрации, в процессе и после реставрации.

В Главных зданиях Исторического музея (год постройки — 1881 г.), а также ГМИИ имени А.С. Пушкина (1912 г.) находятся экспозиционные залы и фондохранилища, в которых хранятся уникальные музейные предметы. Оба музея относятся к условному типу крупных музеев-галерей после реставрации и оба их здания являются объектами культурного наследия федерального значения. Главный дом бывшей усадьбы Лопухиных (впервые упоминается в 1689 г.) в настоящее время является музеем Международного центра Рерихов и также относится к этой группе, однако имеет свои особенности. Он представляет собой не столь крупный по размеру общественный музей также после реставрации. Театр Гонзаго в составе музея-усадьбы «Архангельское» был исследован в процессе реставрации, а здание дома-музея Д.И. Менделеева, сравнительно недавно музейфицированное, до сих пор поддерживается в условиях предстоящих реставрационных работ.

В Главном здании Исторического музея проблемы повреждения стен носят периодический характер. Конструктивные особенности здания не позволяют полностью решить проблему поступления влаги в стены, в связи с чем периодически возникают локальные проблемы протечек и переувлажнения ограждающих конструкций, что требует проведения локальной антимикробной обработки.

Микробиологические исследования стен музейных помещений

Музей	Количество потенциальных очагов микробного роста (способствующие факторы)*	Преобладающие в пробах бактерии и грибы**		Численность микроорганизмов в пробах (число КОЕ в 1 г пробы), мин./макс.	
		до антисептирования	через год после антисептирования	до антисептирования	через год после антисептирования
Государственный исторический музей. Главное здание (Москва)	Выборочный микробиологический анализ в участках протечек (30 зон)	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Acetoniopsis sp.</i> Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Microssoccus sp.</i>	Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> Микроскопические грибы: <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i>	$3,5 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^4$ / $5,2 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^3$	$10 / 5,0 \cdot 10^2 \pm 3 \cdot 10$
ГМИИ имени А.С. Пушкина. Главное здание (Москва)	Выборочный микробиологический анализ в участках локального переувлажнения (15 зон)	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Rhizoglyphus sp.</i> , <i>Ulocladium sp.</i> Бактерии: <i>Bacillus sp.</i>	Рост не обнаружен	$7,8 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^2$ / $5,2 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^3$	$< 10^2$
Музей-усадьба «Архангельское». Театр Гонзаго (Московская область)	Микробиологический анализ строительных конструкций (80 участков различных строительных материалов и характера их повреждения)	Микроскопические грибы: <i>Arhizoglyphus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Tritirachium sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Scorulariopsis sp.</i> , <i>Acetoniopsis sp.</i> Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Microssoccus sp.</i>	Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> Микроскопические грибы: <i>Penicillium sp.</i>	$2,3 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^2$ / $8,5 \cdot 10^4 \pm 5 \cdot 10^3$	$10 / 5,0 \cdot 10^2 \pm 3 \cdot 10$
Музей-усадьба Д.И. Менделеева в Боблово (Московская область)	Микробиологический анализ строительных конструкций (45 участков различных строительных материалов и характера их повреждения)	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Mycelia sterilia</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Verticillium sp.</i> Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	Рост не обнаружен	$3,7 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^2$ - / $4,6 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^4$	$< 10^2$
Главный дом бывшей усадьбы Лопухиных Международного центра Рерихов (Москва)	Выборочный микробиологический анализ в участках локального переувлажнения (40 зон)	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Tritirachium sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Rhizoglyphus sp.</i> Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i>	Бактерии: <i>Bacillus sp.</i> Микроскопические грибы: <i>Penicillium sp.</i>	$7,9 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^2$ / $9,5 \cdot 10^4 \pm 5 \cdot 10^3$	$10 - / 3,0 \cdot 10^2 \pm 2 \cdot 10$

Примечание:

* — выявленные зоны высокого влагосодержания, превышающего 7,5—10%;

** — результаты получены по результатам микробиологического анализа 50—500 проб по каждому объекту

Микробиологический контроль спустя три года после обеззараживания с использованием биоцидных составов и полного подавления роста численности грибов и бактерий показал низкие концентрации микроорганизмов в пробах (не более 300 КОЕ в 1 г пробы), несмотря на условия повышенного влагосодержания стен. Наличие факторов, способствующих микробному росту, требует дальнейшего микробиологического мониторинга стен.

Микробиологический мониторинг и своевременные обработки дают возможность избежать проблем биоповреждения стен и самих экспонатов даже в условиях до проведения реставрационных работ при наличии дополнительных факторов роста биодеструкторов, что показано на примере усадьбы Д.И. Менделеева.

В условиях налаженного температурно-влажностного режима в экспозиционных залах Исторического музея и ГМИИ имени А.С. Пушкина такие исследования позволяют решить проблему периодического неизбежного для памятников архитектуры и случайного проявления факторов, способствующих микробному росту, до начала распространения в другие помещения и заражения экспонатов. Особенно важна роль мониторинга для музеев в зданиях, в которых невозможно полностью обеспечить современную систему создания температурно-влажностного режима в экспозиционных залах вследствие конструктивных особенностей памятников, таких как музей Международного центра Рерихов с сохранившимся старинным фундаментом с каменной кладкой, а также Театра Гонзаго Музей-усадьбы «Архангельское», в которых функционирование современных систем вентиляции и кондиционирования не может быть исполнено в полной мере без нарушения конструктивных особенностей этих памятников.

Микробиологические исследования воздушной среды музейных помещений. Микроорганизмы, находящиеся в воздухе, относятся, в основном, к сапрофитным видам, причем в большинстве они представлены кокками, споровыми палочками, пигментированными бактериями, микроскопическими грибами. В воздухе они находятся во взвешенном состоянии и обычно фиксируются на частичках пыли или мельчайших капельках воды. Так формируется естественный бактериальный аэрозоль, который перемещается в воздухе в горизонтальном и вертикальном направлениях.

Для примера в настоящей статье представлены четыре музея, в помещениях которых воздушная среда исследовалась с целью своевременного выявления биоповреждения предметов хранения, экспонатов и участков стен с помощью аэромикробиологического анализа (табл. 3).

В подземном музее Палат бояр Романовых в Зарядье представлен уникальный экспонат — музейфицированный культурный слой. Условия Подземного музея не могут обеспечивать длительную сохранность такого экспоната от биоповреждений и требуют периодической антимикробной обработки. В то же время избыточное внесение биоцидных составов в профилактических целях нежелательно ввиду их воздействия на экспонат. Отбор проб материала также представляет дополнительную дезинтеграцию его структуры. С этой целью ведется аэромикробиологический мониторинг в нише с культурным слоем, по результатам которого получают данные об интенсификации микробных процессов в грунте экспоната.

В библиотеке князей Юсуповых в Музее-усадьбе «Архангельское» — одном из самых крупных частных книжных собраний России XVIII — первой трети XIX веков, проводился аэромикробиологический мониторинг в музейных книжных шкафах. В результате были выявлены зоны на полках, в воздухе которых наблюдался повышенный уровень микробной контаминации вследствие наличия биоповреждения в книгах, находящихся в этих зонах. Это дало возможность значительно сократить объем микробиологического обследования книг.

В музее-усадьбе Д.И. Менделеева аэромикробиологический анализ в экспозиционных помещениях позволил выявить зоны повышенного уровня микробной контаминации, причиной которого послужил рост бактерий и грибов в кладке стен. Примыкание шкафов и витрин к стенам затрудняет доступ и своевременное выявление «очагов» микробного развития.

В музее Международного центра Рерихов выявленные зоны повышенного уровня микробной контаминации в непосредственной близости от увлажнителя дали возможность обнаружить начальный рост грибов и бактерий на картине. Макроскопическое обследование картин в музеях также затруднено с учетом сложности их демонтажа.

В помещениях Галереи искусства стран Европы и Америки ГМИИ имени А.С. Пушкина исследования воздушной среды установили низкий уровень микробной контаминации, за исключением единичных случаев сбоя системы вентиляции и кондиционирования. После устранения причин случайных факторов микробного роста и подавления его очагов на стенах или экспонатах уровень микробной контаминации воздуха возвращался к норме.

Следует отметить, что для музеев до сих пор не выработаны критерии и нормы безопасного уровня микробного загрязнения воздуха.

Микробиологические исследования воздушной среды музейных помещений

Музей	Цель аэромикробиологического анализа	Преобладающие в пробах бактерии и грибы		Численность микроорганизмов в пробах*	
		В зонах умеренного уровня микробной контаминации (ниже 500 КОЕ в 1 м ³)	В зонах высокого уровня микробной контаминации (свыше 1000 КОЕ в 1 м ³)	Разброс значений, КОЕ в 1 м ³	Выявленные зоны высокого уровня микробной контаминации, % (локализация зон)**
Музей Исторического музея. Подземный музей Палаты бояр Романовых в Зарядье (Москва)	Косвенное выявление микробного роста на экспонатах — музеефицированного культурного слоя, грунта и археологических музейных предметов путем отбора проб воздуха вблизи экспонатов	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Acetabularia sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i>	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Acetabularia sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i> , <i>Microcococcus sp.</i>	180±9—3120±160	32 (вблизи музеефицированного культурного слоя, вблизи витрины с деревянными археологическими экспонатами, зона грунта у Домовой печи)
Музей-усадьба «Архангельское». Библиотека князей Юсуповых (Московская область)	Косвенное выявление микробного роста на книгах, хранящихся в шкафах, пробы воздушной среды которых исследовались	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i>	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i> , <i>Microcococcus sp.</i>	720±36—1810±90	18 (в шкафах, в которых впоследствии были выявлены зараженные книги)
Музей-усадьба Д.И. Менделеева в Боблово (Московская область)	Косвенное выявление микробного роста на стенах за музейными предметами путем отбора проб воздуха в помещениях	Микроскопические грибы: <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i>	Микроскопические грибы: <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Tritirachium sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i> , <i>Verticillium sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Microcococcus sp.</i>	410±20—2820±140	75 (вблизи стен, закрытых шкафами)
Главный дом бывшей усадьбы Лопухиных Международного центра Рерихов (Москва)	Косвенное выявление микробного роста на картинах	Микроскопические грибы: <i>Penicillium sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i>	Микроскопические грибы: <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i> Бактерии: <i>Vacillus sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Microcococcus sp.</i>	40±2—980±49	8 (вблизи картины, расположенной на стене в непосредственной близости от функционирующего увлажнителя)

Примечание:

* — результаты по микробиологическому анализу 20—150 проб по каждому объекту;

** — свыше 1000 КОЕ в 1 м³

Проведенный аэромикробиологический мониторинг в помещениях разных московских и областных музеев дал возможность оценить концентрацию воздушной микробиоты, которая определяется многими факторами: температурно-влажностным режимом, наличием вентиляции, сезонными условиями, числом посетителей, наличием источников заражения внутри помещения.

Микрофлора воздуха чрезвычайно разнообразна и зависит в количественном и качественном отношении от ряда факторов, главным образом, от состояния погоды, времени года, а в помещениях — от их содержания, способа уборки, вентиляции и т.д. Например, после сухой уборки помещения количество микробов в воздухе возрастает во много раз. В воздухе закрытых помещений, имеющих хорошую вентиляцию, количество микроорганизмов обычно ниже, чем в воздухе неветилируемых или слабо вентилируемых помещений.

Микробиологическое исследование музейных ценностей. Микробиологические исследования предметов хранения и экспозиции имеют основную цель — определить целесообразность проведения антимикробной обработки и разработать оптимальный способ такой обработки с учетом выявленных соотношений преобладающих бактерий и микромицетов и их численности.

При обнаружении признаков биоповреждения результаты микробиологического исследования позволяют подготовить предмет к дезинфицирующей обработке перед реставрацией. В случае ошибок при проведении дезинфекции процессы биоповреждения могут возобновиться и потребуются повторная реставрация. Один из примеров — реставрация икон из фонда Исторического музея, длительное время хранившихся в подклете Покровского собора. На иконах был обнаружен грибной мицелий, в связи с чем была проведена очистка, фунгицидная обработка и последующая реставрация. Вскоре начались процессы вспучивания красочного слоя и его растрескивание. Проведенный микробиологический анализ показал присутствие в пробах грунтового слоя бактерий рода *Vacillus* в концентрации свыше 50 КОЕ в 1 мкг пробы. Именно бактерицидная обработка позволила решить проблему вспучивания, а после повторной реставрации процессов биодеструкции больше не обнаруживалось.

Деревянные предметы подвержены риску биозаражения и при экспонировании. Так, в результате исследования деревянной телеги (XIX в.) из фонда

Исторического музея были найдены участки биодеструкции и выявлены грибы родов *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Verticillium sp.*, *Raecilomyces sp.*, а также бактерии в численности 24–38 КОЕ в 1 мкг пробы. Было рекомендовано провести дезинфицирующую обработку в связи с тем, что экспонирование зараженных предметов может стать источником распространения микроорганизмов на другие экспонаты и, следовательно, требует своевременных мер по обеззараживанию.

Наибольшую сложность для экспонирования представляют музейные предметы, состоящие из различных материалов. Так, шедевр коллекции Музея Отечественной войны 1812 года «Сани Наполеона», на которых, по легенде, Наполеон покинул Россию в ноябре 1812 г., имеют открытый кузов, выполненный из тонкого изогнутого деревянного листа, пропитанного водоотталкивающим составом и покрытого лаком, деревянные полозья, окованные тонкой металлической лентой, и два кожаных сиденья. Именно на кожаных сиденьях появились следы биоповреждения в витрине в процессе экспозиции. Микробиологический анализ показал наличие в пробах бактерий и грибов родов *Aspergillus* и *Verticillium*. Результатом антимикробной обработки кожи, проведенной на начальных стадиях биоповреждения, как показывают многолетние наблюдения, является отсутствие роста грибов на поверхности экспоната.

В ГМИИ имени А.С. Пушкина находится фондохранилище деревянных рам XVII–XIX вв. Несмотря на то, что большинство рам имело внешние признаки повреждения дерева и позолоты, однако, как показали результаты микробиологического анализа, только в отдельных случаях зафиксирован рост микроорганизмов.

Биоповреждениям подвержены не только органические материалы, но и неорганические. В условиях повышенной влажности повреждаются и предметы из керамики и камня. Так, в помещении Подземного музея Палат бояр Романовых в Зарядье в течение месяца были заражены несколько экспонатов, результатом которого стало образование грибного мицелия рода *Raecilomyces* на их поверхностях. Такие аварийные ситуации неизбежны в связи с конструктивными особенностями помещений хранения. В этом случае остается только выявить на ранней стадии начальный этап биодеструкции и на основании микробиологического анализа провести соответствующие меры по обеззараживанию.

Произведения скульптуры относятся к наиболее простым для обеспечения сохранности типам музейных объектов, если они экспонируются в музейном помещении, и наиболее уязвимым типам для биоповреждения, если они находятся под открытым небом. Проведенные исследования показали, что уникальные скульптурные изваяния IX—XI вв. «Каменные бабы», находящиеся в интерьере Главного здания Исторического музея, несмотря на наличие налетов на поверхности, не подвержены микробному повреждению.

В пробах были обнаружены единичные колонии грибов и бактерий, очевидно, осевших из воздуха. Тогда как поверхностный слой «Каменных баб», находящийся под открытым небом в Музее-усадьбе «Абрамцево», характеризовался образованием окрашенных налетов и порошковидным разрушением песчаника.

Следует также отметить высокую степень обростания каменных поверхностей биопленками, образованными альгобактериальными ассоциациями бактерий и зеленых микроводорослей, в составе которых доминируют представители рода *Chlorella*, а также эпилитных лишайников родов *Physcia* и в меньшей степени *Xanthoria*, которые также играют значительную роль в разрушении каменных субстратов.

В пробах также были обнаружены микроскопические грибы в концентрациях свыше 10^5 КОЕ в 1 г пробы, что практически соответствует показателям микробного состава почв. Среди грибов во все пробах преобладали представители рода *Aspergillus*, среди бактерий — *Rhodococcus sp.*, *Nitrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* и *Nocardia sp.*

Заключение

Таким образом, рассматривая проблему биоповреждений музейных ценностей, необходимо понять потенциальную способность обнаруживаемых микроорганизмов и определить степень микробной контаминации памятников в различных условиях окружающей среды в музейных помещениях.

Результаты биомониторинга являются основой для разработки соответствующей технологии обеззараживания и биологического контроля, которая включает в себя систематическое применение превентивных мер и эффективную дезинфекционную обработку, особенно необходимую в том случае, когда превентивная работа оказывается неудовлетворительной.

Проведенный анализ некоторых основных результатов микробиологического исследования в музеях

свидетельствует о необходимости выделить следующие наиболее актуальные вопросы комплексного микробиологического мониторинга:

- определение допустимых уровней зараженности воздушной среды и ограждающих конструкций в музейных помещениях, обеспечивающих сохранность памятников;
- определение оптимального набора контролируемых параметров и способа обработки данных мониторинга;
- совершенствование технологий сохранения музейных объектов от биоповреждений.

Литература

1. Билай В.И. Основы общей микологии: Учеб. пособие для вузов. — Киев: Издательство «Вища-школа», 1980. — 360 с.
2. Добровольская Т.Г., Лысак Л.В., Скворцова И.Н. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. — М.: Издательство Московского университета, 1989. — 72 с.
3. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с англ. / Под ред. Хоулта Д., Крига Н., Снита П., Стейли Д., Уильямса С. — М.: Мир, 1997. — Т. 1. — 432 с.; Т.2. — 368 с.
4. Петушкова Ю.А., Крупина М.В., Петушкова Ю.П., Гусев М.В. Биогеохимическое исследование известняка памятников архитектуры // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. — 2005. — № 2. — С. 23–30.
5. Петушкова Ю.А., Орлов Т.В., Кандыба П.Е., Петушкова Ю.П. Аэромикробиологическое исследование музейных помещений с применением статистического анализа. // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. — 2004. — № 4. — С. 28–38.
6. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. Пер. с англ. — М.: Мир, 2001. — 486 с.
7. Piñar G. et al. Microbial survey of the mummies from the Capuchin Catacombs of Palermo, Italy: biodeterioration risk and contamination of the indoor air // FEMS Microbiol. Ecol. — 2013. — Vol. 86(2). — P. 341–356.
8. Sterflinger K., Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97(22). — P. 9637–9646.
9. Urzi C., Krumbein W.E. Microbial impacts on the cultural heritage. Durability and change / In: The Science, Responsibility, and Cost of Sustaining Cultural Heritage. Ed. W.E. Krumbein. — Chichester (England), John Wiley & Sons Ltd., 1994. — P. 107–135.

**THE ROLE OF MICROBIOLOGY IN THE PRESERVATION
OF HISTORICAL AND CULTURAL MONUMENTS
IN MUSEUMS OF MOSCOW AND MOSCOW REGION**

Ju.A. PETUSHKOVA, Ju.P. PETUSHKOVA

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

The microbiological testing of microbiota in the process of deterioration of museum objects and fencing structures in museums of Moscow region was carried out. Also the atmosphere in the halls and depositories was analyzed. It was shown the need for biomonitoring in the museum premises for the timely prevention of biological degradation of materials in the historical and cultural monuments and museum collections.

Keywords: microbiology, biodeterioration, historical and cultural monuments, museums of the Moscow region, preservation.

ПОЛИТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ФОРМИРОВАНИЯ НОРМАТИВНОЙ ПРАВОВОЙ БАЗЫ В СФЕРЕ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ

Ю.А. ПЕТУШКОВА*

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Статья посвящена сравнительному рассмотрению различных примеров политики в сфере генной инженерии. Был исследован опыт Европейского Союза, Швейцарии, Аргентины, Канады, Китая и России в реализации политики в сфере генной инженерии и ее влияния на правовое регулирование и формирование законодательства. На примере зарубежного опыта был выделен ряд наиболее предпочтительных подходов к совершенствованию законодательства в сфере генно-инженерной деятельности в Российской Федерации.

Ключевые слова: политика в сфере генно-инженерной деятельности, ГМО, правовое регулирование, законодательство в сфере генно-инженерной деятельности.

С активным развитием методов генной инженерии и, как следствие, появлением новых видов общественных отношений, связанных с внедрением и использованием таких методов, перед каждым государством встает проблема введения их регулирования. Правовое регулирование генно-инженерной деятельности (ГИД) ставит перед собой одновременно несколько задач. Во-первых, основной задачей является законодательное стимулирование развития генной инженерии как одного из важнейших инструментов для развития современной медицины, сельского хозяйства, промышленности, экологии и других значимых отраслей. Во-вторых, роль государства заключается в осуществлении контроля и надзора в данной сфере с целью обеспечения экологической, санитарно-эпидемиологической и пищевой безопасности использования результатов генной инженерии. В-третьих, эффективное применение разработок генно-инженерной деятельности может быть только тогда, когда такая деятельность урегулирована всеми отраслями права, включая отрасли гражданского (для упрощения процедуры осуществления сделок в сфере ГИД), налогового (для введения финансовых мер стимулирования), таможенного (для проведения внешнеторговых операций, включая импорт и экспорт) права и другие отрасли права.

Каков будет баланс между стимулирующими и ограничивающими нормами права в сфере ГИД, насколько эффективно будет работать соответствующая система государственного контроля и надзора — это зависит от каждого государства и от того политического курса, который установлен в отношении биотехнологии в целом и ее места в определяющих государственных программных документах.

Политические предпосылки определяют основной вектор формирования и дальнейшего совершенствования законодательства, что иллюстрируется на примерах различных стран мира, занимающих одни из лидирующих позиций в сфере ГИД.

В статье рассмотрены несколько примеров, представляющих полярные типы политических моделей формирования законодательства в сфере правового регулирования ГИД с использованием базовых правовых норм, отличающих их друг от друга.

Европейский Союз

Европейские страны — члены Европейского Союза в ходе осуществления правового регулирования руководствуются нормами европейского права. При этом каждое национальное законодательство имеет свои особенности, которые проявляются в различных отраслях права и сферах правового регулирования.

Политика Европейского Союза направлена на стимулирование ГИД с гибкой системой правового регулирования, основанной на разработках «наилучшей практики».

© 2016 г. Петушкова Ю.А.

* Автор для переписки:

Петушкова Юлия Алексеевна

к.б.н., ст.н.с. каф. биоинженерии,

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: jupponline@gmail.com

Особенностью европейской концепции правового регулирования ГИД является фундаментальный подход к формированию законодательной базы. Это выражается в последовательном создании правовых норм с предварительным анализом правовых последствий их введения. Нормотворчество в Европейском Союзе начинается с разработки общих политических программ и их последующего закрепления в ненормативных актах Еврокомиссии. Задача таких актов, так называемых Сообщений Еврокомиссии (Communications) — обозначить проблему и расставить акценты. Следующим этапом формирования нормативной правовой базы является постепенная разработка на основе заданного курса неких правил, представляющих собой прообраз будущих правовых норм, выраженных в Рекомендациях, разработанных на основе предложений ФАО, ВОЗ, ОЕСР. Далее на основе анализа правоприменительной практики формируются Решения (Conclusions) Европейского Совета о придании юридической силы тем нормам, которые были сформулированы в Рекомендациях и в течение времени успешно применялись.

Только после всей этой процедуры принимаются законы в виде Директив (Directives) или Регламентов (Regulations). И даже после введения в действие законов высшие органы Европейского Союза продолжают мониторинг правоприменения законодательства, по ходу которого издаются документы в виде Мнения (Opinions) с предложениями о совершенствовании законодательства.

Так, в Европе принимались основные законы в сфере ГИД. Директива 2001/18/ЕС регулирует выпуск ГМО в окружающую среду. Регламент 1829/2003 — порядок получения разрешения на вовлечение в хозяйственный оборот пищи и кормов, произведенных из ГМО, а также общие требования об их маркировке. Детальным требованиям о маркировке ГМ-продукции, предназначенной для употребления в пищу и корма, посвящен отдельный Регламент 1830/2003. Все установленные законами требования разработаны на основе рекомендаций профильных международных организаций. Введенные требования представлены в исчерпывающем перечне; кроме того, определены государственные органы, отвечающие за реализацию введенных норм [1].

Таким образом, политика Европейского Союза в формировании нормативной базы в сфере ГИД основана на последовательном подходе от разработки научно обоснованных критериев оценки безопасности использования разработок генной инженерии до их закрепления сначала в рекомендательных, а только затем — в юриди-

чески обязывающих нормах. Такой подход сформировал эффективную европейскую модель системы контроля и надзора в сфере ГИД при разрешенном выпуске ГМО в окружающую среду.

Швейцария

Политика Швейцарии направлена на стимулирование ГИД с одновременным введением жестких правил, обеспечивающих безопасность внедрения ее результатов.

В основе политики Швейцарии в сфере ГИД лежит решение о введении соответствующих норм в основной закон. В настоящее время Швейцария является единственным государством, в котором основы правового регулирования в сфере биотехнологии закреплены на конституционном уровне. Конституция Швейцарии предусматривает положения, которые косвенно затрагивают ГИД, а также те, которые прямо регулируют ее основные направления.

К первой группе относится положение, согласно которому Конфедерация регулирует опыты на животных и вмешательства в живое животное (ст. 80). Наряду с этим федеральный орган власти издает предписания, обязывающие декларировать происхождение, качество, метод производства и способ переработки продовольственных продуктов (ст. 104). Это положение, в частности, препятствует произвольному внедрению генетически модифицированных организмов (ГМО) в сельское хозяйство. Кроме того, Конфедерация издает предписания по обращению с продовольственными продуктами, а также с лекарствами, наркотиками, организмами, химикалиями и предметами, которые могут угрожать здоровью людей и животных (ст. 118).

Вторая группа норм регулирует биотехнологию непосредственно. Статья 119 посвящена репродуктивной медицине и генной инженерии человека. В качестве основных принципов медицинской биотехнологии Конституция выделяет следующие:

- принцип защиты человека от злоупотреблений генной инженерией и репродуктивной медициной;
- принцип недопустимости всех видов клонирования и вмешательства в наследственный материал гамет и эмбрионов человека;
- репродукция при помощи медицины осуществляется в исключительных случаях, а суррогатное материнство не допускается;
- принцип справедливого распределения органов при осуществлении трансплантации и безвозмездность передачи органов, тканей и клеток;

- другие принципы в связи с этическими аспектами применения биотехнологии.

Экологическая безопасность в области ГИД гарантируется также на конституционном уровне. Статья 120 провозглашает принцип защиты человека и окружающей среды от злоупотребления геной инженерией. Конфедерация регулирует порядок обращения с животными, растениями и другими организмами и охраняет генетическое многообразие животных и растений [6].

Конституция дала предпосылки активному развитию специализирующего законодательства Швейцарии в области ГИД как ни в какой другой стране, практически не оставляя пробелов в правовом регулировании данной сферы.

Использование ГМО, включая их продукцию, распространение, введение в гражданский оборот, разрешается только в случае, если оно не ставит под угрозу здоровье человека и животных, целостность природных экосистем и биоразнообразие. Введение в гражданский оборот (продажа, обмен, дарение и т.д.) ГМО возможно при условии, что это не повлечет исчезновение хотя бы одного вида живых организмов и в долгосрочной перспективе не отразится негативно на каких-либо функциях экосистемы, в которую происходит выпуск ГМО, в частности, на плодородии почв (ст. 6 Федерального закона «О геной инженерии»). В случае причинения существенного вреда человеку, животным или окружающей среде вследствие преднамеренного нарушения законодательства о ГМО ст. 35 предусматривает санкции по 10 составам преступлений. В частности, введение в обращение ГМО без указания на факт генетической модификации, непредоставление стороной по сделке в отношении содержащей ГМО продукции информации и инструкции по ее использованию, несоблюдение установленных производителем правил по использованию ГМО и другие. Контроль над исполнением законодательства о ГМО поручается Федеральной экспертной комиссии по биобезопасности и Федеральной комиссии по этике в отношении биотехнологии в сфере, не связанной с человеком (ст. 22, 23) [11].

Использование организмов, включая генетически модифицированные и патогенные формы, в открытых системах может осуществляться только при условии, что их метаболиты и продукты распада не могут вызывать угрозу окружающей среде и негативным образом воздействовать на биоразнообразие (ст. 29). По общему правилу их выпуск в открытую систему запрещен, однако при обоснованной необходимости предусмотрена возможность получения соответствующего разрешения [12].

Подробнее процедура разрешения регулируется в Ордонансе «Об использовании организмов в открытых

системах». Целью этого акта было, в том числе, защитить продукцию, которая получена без использования ГМО, от ГМО, их метаболитов или продуктов их разложения (ст. 1). При этом к ГМО относят не только живые организмы, но и клеточные, а также неклеточные биологические структуры, способные к воспроизведению и передаче генетического материала (ст. 3). Требования по использованию ГМО в открытых системах включают в себя гарантии отсутствия токсичных или аллергенных веществ и распространения устойчивости к антибиотикам. Кроме того, ГМО не должны каким-либо образом воздействовать на растения и животных, занесенные в Красную книгу. В случае экспериментального выпуска ГМО их новые свойства не должны передаваться диким видам флоры и фауны. ГМО не могут быть разрешены к выпуску в окружающую среду, если они содержат гены устойчивости к антибиотикам, используемым в медицине и ветеринарии, а также, если организм-реципиент обладает инвазивными свойствами (ст. 7). Статья 11 предусматривает гарантии Заявителя (до 20 миллионов франков) на случай неблагоприятных последствий в результате использования ГМО. В целом закон приводит детальный перечень генетических, физиологических, биохимических и экологических свойств ГМО для получения разрешения на выпуск в окружающую среду [18].

Положение статьи 139 Конституции Швейцарии наделяет граждан правом инициировать пересмотр ее положений. Граждане воспользовались этим правом, в том числе, и в сфере правового регулирования биотехнологии. Основываясь на конституционном праве быть огражденными от злоупотреблений геной инженерией, они выступили с инициативой ввести в статью 197 (переходные положения) пункт следующего содержания: «В сельском хозяйстве Швейцарии ГМО не могут быть использованы в течение 5 лет со дня принятия настоящего положения. В частности, не могут быть импортированы и вовлечены в гражданский оборот: а) генетически модифицированные растения, их части, семена, если они способны к воспроизведению и предназначены для использования в открытых системах в сельском хозяйстве, а также в лесных и садоводческих хозяйствах; б) генетически модифицированные животные, предназначенные для производства продуктов питания и других продуктов животноводства». Несмотря на рекомендацию Федерального Собрания Швейцарии отклонить данную поправку, выносимую на голосование народу и кантонам, она была ими принята и вступила в силу в 2005 году [4]. К настоящему моменту срок действия данной поправки истек, однако это остается служить ярким положительным примером

возможности активного участия граждан в регулировании сферы ГИД и экологической безопасности.

Использование в сельском хозяйстве микроорганизмов, патогенных по отношению к насекомым, грибов, бактерий (*Bacillus thuringiensis* и др.) возможно только при условии, что они не являются генетически измененными [17].

Трансграничное перемещение ГМО регулируется специальным Ордонансом. Импортер или экспортер обеспечивает все меры предосторожности во избежание возможных негативных последствий в отношении человека, животных и окружающей среды (ст. 3). ГМО-содержащая продукция должна сопровождаться документацией, в которой должна быть отражена следующая информация: а) четкое указание на то, что товар является генетически модифицированным; б) информация о генетическом маркере, позволяющем идентифицировать данный ГМО, а в случае экспорта — подробную генетическую характеристику; в) инструкция по безопасному использованию, хранению и транспортировке; г) информация об импортере и экспортере и отметка о соответствии данного перемещения положениям Картахенского протокола (ст. 4) [20].

Продукты питания, табачная и алкогольная продукция, а также товары первой необходимости и другие товары, включая посуду, предметы гигиены, одежда, игрушки и даже ювелирные украшения, если предполагается их контакт с телом, а также предметы украшения интерьера, произведенные из ГМО, попадают не только под действие Закона «О продовольственной продукции и товаров первой необходимости», но и под требования законодательства о ГМО с правилами маркировки и особого порядка разрешения их вовлечения в гражданский оборот (ст. 9) [13].

С 2003 г. ужесточились требования к маркировке продукции, содержащей ГМО или изготовленной из ГМО. Так, все продовольственные товары, пищевые добавки, фитосанитарная продукция, удобрения, корма животных, содержащие ГМО, должны иметь маркировку «изготовлено из генетически модифицированного X», где X — название (вид) организма [19].

Эксперименты над животными, включая выделение и изучение клеток, органов, а также тестирование новых веществ, строго регламентированы. Создание, разведение, вовлечение в хозяйственный оборот и использование генетически модифицированных позвоночных животных может быть осуществлено только при наличии соответствующего разрешения, причем только в научных целях или в целях терапии и диагностики заболеваний (ст. 11) [10].

Биоцидная продукция, содержащая ГМО, может быть разрешена к использованию на территории Швейцарии. При этом если не декларируемый предел присутствия ГМО в пищевой продукции по технологически неизбежным причинам равен 0,9%, то для биоцидной продукции он составляет 0,1%, причем даже в этом случае освобождение от обязательного декларирования и маркировки рассматривается как исключение и выдается компетентным органом в зависимости от каждого конкретного случая (ст. 39) [16].

Таким образом, политика Швейцарии в регулировании генно-инженерной деятельности была predetermined с принятием Конституции, после чего законодательство формируется не по европейскому принципу поступательно от рекомендательных норм к обязательным, а практически единовременным введением четкой системы юридически установленных прав и обязанностей граждан, юридических лиц и государственных органов в данной области с предусмотренными санкциями за нарушение законодательства в сфере ГИД.

Китайская Народная Республика

Политика Китая, в том числе, в сфере агробиотехнологии, основана на жестком приоритете отечественных разработок. Ежегодно в Китае утверждается так называемый политический документ № 1, затрагивающий важнейшие вопросы. Сектор генной инженерии попадает в число рассматриваемых приоритетов страны, начиная с 2014 года.

Документ № 1 обозначил намерение оказать финансовую поддержку китайским исследовательским и семеноводческим компаниям, одновременно призывая к намеренному затягиванию регистрации импортной агробиотехнологической продукции, в частности, ГМ-кукурузы и ГМ-риса. В перспективном плане развития 2006–2020 гг. государство предусматривает выделение средств на развитие исследований и разработок биотехнологических модификаций риса, пшеницы, кукурузы, хлопка, а также свиней, крупного рогатого скота и овец с новыми свойствами, в том числе устойчивостью к заболеваниям, и одновременно запрещает иностранные инвестиции в сектор [15]. Так, Китай *de facto* политическим документом вводит на китайский рынок зарубежных биотехнологических гигантов. Такая политика стимулирования национальной генной инженерии предопределяет характер формирования законодательства в данной сфере. Политика Китая сводится к минимизации правового регулирования.

В КНР отсутствует закон о генно-инженерной деятельности, сфера генной инженерии на законодательном уровне практически не регулируется. Именно такой подход позволяет проводить политику двойных стандартов, устанавливая ее в пользу развития национального сектора. Так, отсутствие четких требований по регистрации ГМО, их выпуску в окружающую среду и использованию позволяет уполномоченным органам блокировать регистрацию импортных сортов, действуя при этом в рамках законодательства, одновременно не отказывая в такой регистрации, а только бесконечно оттягивая срок выдачи разрешений. Неопределенные сроки рассмотрения заявок дают возможность как можно дольше затягивать принятие решений о регистрации импортной продукции, в то время как в соответствии с обозначенным политическим курсом можно в кратчайшие сроки выдавать разрешение на производство и использование отечественной биотехнологической продукции.

Отсутствие четкой системы правового регулирования в сфере ГИД имеет и отрицательные стороны. Так, опасения вызывает слабая система контроля и надзора в сфере безопасности ГИД. Только с 2015 года введены нормы об обязательной маркировке ГМ-продукции, которая касается импортных товаров [5]. Маркетинг в Китае также защищает права национальных производителей и ущемляет права импортеров. Маркировка «без ГМО» может быть использована в рекламе только для той продукции, которая относится к списку зарегистрированных в Китае ГМ-культур и, соответственно, должным образом проверяется [14]. Так, Китай законодательно не обезопасил себя от неконтролируемого распространения непроверенной на безопасность национальной ГМ-продукции, однако предусмотрел эффективные меры контроля за оборотом импортной продукции генной инженерии.

Единственным правовым актом, регулирующим сферу агробиотехнологии в Китае, являются Правила регулирования безопасности сельскохозяйственных ГМО. Правила выпущены Министерством сельского хозяйства, а изменения, предлагаемые в 2015 году, приводят к еще большей неопределенности в процедуре регистрации ГМ-сортов, так как предложение убрать сроки для рассмотрения новых модификаций дает регистрирующему органу возможность сколь угодно долго рассматривать заявки. Новые нормы по социально-экономическим исследованиям, требуемым для утверждения новых импортных биотехнологических продуктов, становятся практически невыполнимыми [7].

Таким образом, политику в сфере ГИД в Китае и намеренное сдерживание развития законодательства

при всех его правовых лакунах можно считать последовательной, защищающей национальные интересы и стимулирующей исключительно национальные генно-инженерные разработки.

Канада

Политика Канады в сфере регулирования ГИД основана на концептуальном подходе, согласно которому продукция генно-инженерной деятельности регулируется таким же образом, как и любая иная новая продукция, в отношении которой выдвигаются требования по безопасности.

Изначально Канада действовала по принципу отказа от введения специального законодательства в сфере генной инженерии и введения соответствующих органов государственного управления. В связи с этим действующий орган в сфере пищевой безопасности был дополнительно наделен и полномочием контроля экологической безопасности биотехнологической продукции. При выпуске любых организмов в окружающую среду, которые не свойственны данному ареалу, также оцениваются экологические риски, возникающие в связи с новыми свойствами организма вне зависимости от того, является ли он генно-инженерно-модифицированным или нет. Таким образом, политика Канады в установлении системы контроля и надзора в сфере ГИД руководствуется принципом оценки новых свойств продукции и их воздействия на окружающую среду и здоровье человека независимо от метода получения [21].

Так, основным примером служит их закон, регулирующий оборот пищевой и лекарственной продукции, в котором генно-инженерная продукция рассматривается как любая новая продукция. В соответствии с этим специальная маркировка ГМ-продукции в Канаде не обязательна, а указываться должно только наличие аллергенов или конкретных изменений в нутриентном составе и других новых характеристиках.

В этой связи остается только вопрос размытой формулировки данных требований, что привело к разработке нового правового акта, регулирующего добровольную маркировку и рекламу пищи, содержащей и не содержащей продукцию генной инженерии. В нем устанавливаются четкие требования по формулировкам маркировки, а также всем пороговым значениям в отношении пищевой продукции, содержащей ГМ-ингредиенты, а также по использованным методам генной инженерии [22].

Аргентина

Аргентина, являясь третьим государством по производству ГМ сельскохозяйственных культур вслед за США и Бразилией, придерживается политики государственной поддержки генной инженерии, причем как разработок, так и использования ее результатов.

Государство в поддержку развития биотехнологической агроиндустрии ведет курс на упрощение регистрационных процедур. Так, с 2011 года принято решение сократить установленный ранее период рассмотрения заявлений на регистрацию новых трансформационных событий с 42 до 24 месяцев. Другим примером является отсутствие законодательно определенных требований по маркировке ГМ-продукции. Уполномоченный орган, Министерство сельского хозяйства, исходит из следующих принципов:

- продукты, полученные методами биотехнологии, которые существенно не отличаются по составу от традиционных аналогов, не подлежат маркировке;
- биотехнологические продукты, существенно отличающиеся от традиционных аналогов, могут быть маркированы с указанием новых характеристик;
- в целом маркировку пищевой биотехнологической продукции, прошедшей процедуру оценки безопасности, можно считать нецелесообразной ввиду отсутствия каких-либо свидетельств о риске здоровью потребителей [23].

Фактически в Аргентине система контроля в сфере ГИД основана на принципе возмещения ущерба по факту причинения вреда. Такая система представляет минимальные превентивные меры по обеспечению безопасности, после чего ответственность будут нести лица, осуществляющие деятельность по производству и использованию ГМО, но только в случае выявления реального вреда. Такая политика сокращает расходы компаний на доказательства, связанные с во многом очевидными фактами минимальной вероятности наступления негативных последствий.

Действующее в Аргентине законодательство сформировалось на основе политики стимулирования генной инженерии. Принят закон о семенах и разработках в сфере генной инженерии растений. Статья 32 предусматривает определение субсидий, специальных кредитов на развитие и налоговых льгот объединениям, учреждениям, гражданам и предприятиям, деятельность которых преследует цели фитогенетических разработок. Статья 32 вводит норму по финансированию технологий по разработке растений с новыми свойствами с целью

экономического развития государства. Статья 34 предусматривает создание специального бюджетного счета, из которого будут финансироваться соответствующие фонды для осуществления соответствующих функций государственной поддержки [9].

Отдельный закон Аргентины посвящен продвижению развития и эффективности современной биотехнологии. Он касается стимулирования всех направлений биотехнологии для производства товаров и услуг или улучшения характеристик продуктов, направленных на снижение затрат производства, увеличение продуктивности и других экономических и социальных выгод (ст. 2). Предусмотрены льготы по НДС, ускоренная амортизация, налоговые вычеты и другие меры стимулирования [8].

Российская Федерация

Рассмотрев различные модели политических курсов развития генной инженерии и ее правового регулирования, остается определить, к какой модели ближе всего стоит Россия и опыт какой страны наиболее подходит для заимствования в целях развития генной инженерии.

В одном из основных политических документов, Стратегии национальной безопасности, для решения задач национальной безопасности прямо предусмотрена необходимость развития генной инженерии как перспективной высокой технологии (ст. 70) [2].

При этом, несмотря на обозначенный вектор развития, в правовом аспекте все это время происходило определенное сдерживание развития генной инженерии в целом путем множества косвенных законодательных ограничений, либо очевидных пробелов правового регулирования. В конце концов был установлен запрет на выращивание и разведение растений и животных, генетическая программа которых изменена с использованием методов генной инженерии и которые содержат генно-инженерный материал, внесение которого не может являться результатом природных (естественных) процессов, за исключением выращивания и разведения таких растений и животных при проведении экспертиз и научно-исследовательских работ [3]. Фактически это выражается во внесенных поправках в природоохранное законодательство, оставляя без внимания тот факт, что вводимый запрет ставит под вопрос реализацию основных задач и направлений, установленных ФЗ «О государственном регулировании в сфере генно-инженерной деятельности».

**Сравнительный анализ правовой базы в сфере ГИД,
политических предпосылок и особенностей ее формирования**

Страна	Отличительные признаки нормативной базы в сфере ГИД			
	Политические предпосылки формирования	Особенности модели формирования	Недостатки и пробелы в правовом регулировании	Преимущества в правовом регулировании
Европейский Союз	Принцип научной обоснованности подхода к государственному регулированию при различном отношении к ГМО государств-членов	Постепенное формирование законодательной базы на основании анализа применения рекомендательных норм	Многие аспекты, включая введение санкций за правонарушения, остаются в рамках полномочий государств-членов	Общие рамки оставляют возможность государствам-членам проводить национальную политику в сфере ГИД от ограничений до стимулирования в рамках минимальных требований по безопасности ГМ-продукции и выпуску ГМО
Швейцария	Принцип обеспечения безопасности при использовании достижений геной инженерии	Установление регулирования на конституционном уровне. Максимизация нормирования всех направлений ГИД	Жесткие требования к осуществлению ГИД, включая научные цели, избыточное нормирование	Жесткая система регистрации, контроля и надзора в сфере производства и использования ГМО при общей государственной поддержке развития ГИД
Китай	Принцип приоритета национальных биотехнологических разработок и установление барьеров для поступления импортных разработок и продукции	Минимизация правового регулирования для формального обоснования неограниченного увеличения периода рассмотрения заявок импортеров	Недостаточный уровень контроля качества геноинженерной продукции вследствие отсутствия жестких норм по ее безопасности	Правовая новелла: запрет маркировки «не содержит ГМО» для продукции, не зарегистрированной на территории Китая вследствие отсутствия возможности ее контроля
Канада	Принцип равного регулирования и контроля в отношении любого вида новой продукции и любых новых видов, несвойственных целевой экосистеме	Минимизация правового регулирования для устранения искусственных барьеров продвижения ГМ-продукции	Отсутствие специального законодательства в сфере геной инженерии не выделяет и приоритет ее развития, что выражается в отсутствии законодательно установленных льгот	Такая модель гарантирует безопасность продукции вне зависимости от методов ее производства
Аргентина	Принцип активного внедрения геной инженерии в сельском хозяйстве в экономических целях	Развитие специального законодательства по стимулированию биотехнологии	Ослабление системы контроля и надзора за ГМ-продукцией и выпуском ГМО	Введение большого количества законодательно установленных налоговых льгот и других мер стимулирования, упрощение процедуры регистрации ГМО
Россия	Принцип развития геной инженерии на декларативном уровне	Постепенное законодательное ограничение ГИД вплоть до запретов ряда направлений	Отсутствие эффективной системы регистрации, контроля и надзора в сфере производства и использования ГМО; запрет на разведение/выращивание ГМ-животных/растений, в том числе, в целях развития медицинских, экологических, сельскохозяйственных направлений	Наличие системы контроля безопасности пищевой ГМ-продукции

Рассматривая основные этапы формирования законодательства в сфере ГИД, можно выделить следующие периоды.

1) Законодательно установленное общее разрешение на выпуск ГМО в окружающую среду при отсутствии легальной процедуры получения конкретного разрешения на такой выпуск и одновременном отсутствии санкций за нарушения в сфере выпуска ГМО в окружающую среду.

2) Появление санкций за соответствующие правонарушения при отсутствии надлежащей системы регистрации, контроля и надзора для выявления таких правонарушений.

3) Законодательно установленный запрет на выпуск ГМО в окружающую среду при отсутствии надлежащей системы регистрации, контроля и надзора для выявления таких правонарушений.

В итоге можно говорить о непоследовательном курсе политики Российской Федерации в отношении ГИД, что приводит к многочисленным нестыковкам в правовом регулировании данной сферы.

Сравнительный анализ законодательств разных стран в сфере ГИД

Результаты сравнительного анализа политических моделей формирования законодательства и созданных систем правового регулирования в сфере генной инженерии приведены в таблице 1.

Заключение

В результате сравнительного анализа политики в сфере генно-инженерной деятельности государств с развитой биотехнологией и ее влияния на формирование национальных законодательств можно заключить следующее:

- Россия, по сравнению с другими странами, находится в проигрышном положении, с точки зрения перспективы развития генной инженерии, к чему приводят законодательно установленные барьеры;
- рассматривая опыт зарубежных стран, становится очевидным, что политика Швейцарии не может быть внедрена в России в связи с отсутствием возможности внедрения налаженного жесткого механизма в ныне существующую российскую систему права, политика Китая — в связи с неготовностью блокировать импорт, политика Аргентины — в связи с неготовностью финансировать «нетрадици-

онные» методы сельского хозяйства. Кроме того, каждая модель имеет и другие недостатки;

- наиболее приемлемым примером является политика Канады и Европейского Союза с их научно обоснованным, экономически ориентированным и в целом отвечающим требованиям безопасности подходом к формированию законодательства в сфере ГИД.

Литература

1. Петушкова Ю.А. Инициативы в биотехнологии: общие подходы, мировой опыт, законодательное обеспечение // Вестник Совета Федерации. — 2012. — № 12. — С. 64–67.
2. Указ Президента РФ от 31.12.2015, № 683 «О стратегии национальной безопасности Российской Федерации» // СЗ РФ, 04.01.2016, № 1 (часть 2), ст. 212.
3. Федеральный закон от 03.07.2016 № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности» // СЗ РФ, 04.07.2016, № 27 (часть 2), ст. 4291.
4. Arrêté fédéral concernant l'initiative populaire «Pour des aliments produits sans manipulations génétiques» du 17 juin 2005 // Feuille fédérale. — 2005. — P. 3823–3824.
5. China food safety law, USDA report 18.05.2015.
6. Constitution fédérale de la Confédération suisse du 18 avril 1999 // Recueil officielle du droit fédéral. — 1999. — P. 2556–2611.
7. English.agri.gov.cn.
8. Ley 26.270. Promocion del desarrollo y produccion de la biotecnologia moderna. Boletín Oficial del 27-jul-2007 Número: 31205 Página: 1.
9. Ley de semillas y creaciones fitogeneticas № 20.247. Boletín Oficial del 16-abr-1973 Número: 22648.
10. Loi fédérale du 16 décembre 2005 sur la protection des animaux (LPA) L'Assemblée fédérale de la Confédération suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 2008. — P. 2965–2978.
11. Loi fédérale du 21 mars 2003 sur l'application du génie génétique au domaine non humain (Loi sur le génie génétique, LGG) L'Assemblée fédérale de la Confédération suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 2003. — P. 4803–4834.
12. Loi fédérale du 7 octobre 1983 sur la protection de l'environnement (Loi sur la protection de l'environnement, LPE) (mod. 1er août 2010) L'Assemblée fédérale de la Confédération suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 1984. — P. 1122.
13. Loi fédérale du 9 octobre 1992 sur les denrées alimentaires et les objets usuels (Loi sur les denrées alimentaires, LDAI) (mod. 1er avril 2008) L'Assemblée fédérale de la Confédération suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 1995. — P. 1469.

14. moa.gov.cn.
15. National science and technology report service // www.nstrs.cn.
16. Ordonnance concernant la mise sur le marché et l'utilisation des produits biocides (Ordonnance sur les produits biocides, OPBio) du 18 mai 2005 // Recueil officielle du droit fédéral. — 2005. — P. 2821–2868.
17. Ordonnance DFE du 7 décembre 1998 sur l'agriculture biologique Modification. Le Département fédéral de l'économie // Recueil officielle du droit fédéral. — 1997. — P. 2519.
18. Ordonnance du 10 septembre 2008 sur l'utilisation d'organismes dans l'environnement (Ordonnance sur la dissémination dans l'environnement, ODE) Le Conseil fédéral suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 2008. — P. 4377–4442.
19. Ordonnance du 19 novembre 2003 sur les modifications d'ordonnances dues à la loi sur le génie génétique. Le Conseil fédéral suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 2003. — P. 4793–4800.
20. Ordonnance du 3 novembre 2004 sur les mouvements transfrontières des organismes génétiquement modifiés (Ordonnance de Cartagena, OCart). Le Conseil fédéral suisse // Recueil officielle du droit fédéral. — 2004. — P. 4801–4810.
21. Regulating Agricultural Biotechnology in Canada: An Overview. // <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/general-public/overview/eng/1338187581090/1338188593891>.
22. Voluntary labelling and advertising of foods that are and are not products of genetic engineering. National Standard of Canada. May 2016. CAN/CGSB-32.315-2004.
23. Yankelevich Andrea. Argentina annual biotechnology report. USDA. 7/22/2015.

POLITICAL PREREQUISITES FOR THE FORMATION OF LEGISLATION IN THE FIELD OF GENETIC ENGINEERING IN RUSSIA AND ABROAD

Ju.A. PETUSHKOVA

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

The article is devoted to comparative study of different genetic engineering policies. The practices of the European Union, Switzerland, Argentina, China, Canada and Russia in the genetic engineering policies impact on the legal regulation as well as the legislation shaping were examined. The most appropriate approaches to improving the genetic engineering legal system in the Russian Federation were revealed.

Keywords: genetic engineering policy, GMO, legal regulation, genetic engineering legislation.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2016 ГОДА *

СОБЫТИЯ

К 150-летию формулирования биогенетического закона

В 2016 году исполняется 150 лет со времени формулирования основного биогенетического закона, или закона Геккеля — Мюллера, который гласит: «Онтогенез повторяет филогенез». Он сыграл большую роль в развитии биологии, хотя впоследствии его афористичная краткость вместе со смыслом подверглись критике. Содержательная база закона подготавливалась всем ходом развития биологии начала и середины XIX века, особенно исследованиями К. Бэра и Ч. Дарвина. Историческое значение этого закона непреходяще, а сам принцип рекапитуляции благодаря критике и модификации помог всесторонне разработать учение о связи онтогенеза и филогенеза в его современном виде.

К 100-летию открытия явления анеуплоидии

100 лет назад ученик Т.Х. Моргана К. Бриджес (1889—1938) открыл явление анеуплоидии — нерасхождения X хромосом в мейозе. Это было важным достижением в цепи беспрецедентных открытий, непрерывно делавшихся в школе Моргана. Сейчас хорошо понято истинное значение данного явления в плане риска развития уродств и других аномалий. Ныне сам по себе этот феномен является рутинным фактом, в особенности в практике цитогенетических лабораторий, но в период формирования генетики как науки в начале XX века он по достоинству был воспринят современниками и ретроспективно высоко оценивался в последующее время историками науки.

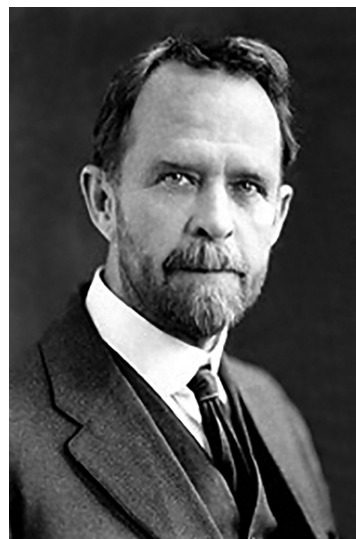
К 50-летию расшифровки генетического кода

1966 год был знаковым для молекулярной биологии. В этом году был завершен процесс расшифровки генетического кода. К тому времени снизился эмоциональный всплеск, связанный с ошеломляющей работой М. Ниренберга и Г. Маттеи 1961 года о генетическом коде фенилаланина. Банальная простота троичности

данного кода и использования аналога лентопротяжного механизма для штамповки копий — это потрясло весь научный мир, который ожидал здесь сверхсложности, достойной извечной тайны жизни. После 1961 года к исследованиям по расшифровке генетического кода подключились, кроме группы Ниренберга, Х.Г. Корана с методом прямого синтеза и С. Очоа со своей методологией. В этой конкуренции умов да еще под непосредственным наблюдением Ф. Крика дело подвигалось быстро, и к 1966 году материал по всем 20 аминокислотам и 64 кодонам был получен. Нобелевская премия за эти работы также не заставила себя долго ждать — в 1968 году М. Ниренберг, Х.Г. Корана и Р. Холли получили ее (последний — за установление полной нуклеотидной последовательности переносящей аланин РНК, изолированной из дрожжей, а также за определение комплементарности между транспортной и информационной РНК — «модель трехлистного клевера»).

ПЕРСОНАЛИИ

150 лет со дня рождения Т.Х. Моргана



В 2016 году исполняется 150 лет со дня рождения Томаса Ханта Моргана (1866—1945), который представляет собой одну из крупнейших фигур в истории биологии. Его имя не нуждается в подробных описаниях и комментариях. Он внедрен в саму ткань содержательной сущности биологических знаний, поскольку каждая его оригинальная экспериментальная работа была преемственным экстраординарным событием в жизни науки,

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

которое непременно включалось в ее летописный фонд. Он фактически является одним из основателей генетики, ее методологии и языка, создателем хромосомной теории наследственности (совместно с К. Бриджесом, А. Стертевантом и Г. Меллером), линейной теории гена и др. Безусловное мировое признание, награждение Нобелевской премией (1933), повсеместное постоянное цитирование — это прямое следствие его выдающихся заслуг в науке.

Он был избран иностранным членом-корреспондентом Российской академии наук (1923) и иностранным почетным членом Академии наук СССР (1932). Тема «Морган и русские ученые» заслуживает несколько более широкого рассмотрения. В России и СССР в разные времена его имя претерпевало разную степень общественного отношения — от реального признания специалистами до официального государственного неприятия. Между тем связи отдельных русских биологов с ним и его учениками (например, Г. Меллером) всегда отличались постоянством и взаимным уважением. Так, в 1932 году в Итаке (США) на VI Международном генетическом конгрессе Морган активно общался с Н.И. Вавиловым и Н.В. Тимофеевым-Ресовским (рис. 1). Морган даже шутил говорил об этом: «I am captured by Russians!» («Я в русском плену!»).



Рис. 1. Слева направо: Н.И. Вавилов, Т.Х. Морган, Н.В. Тимофеев-Ресовский на VI Международном генетическом конгрессе в Итаке (1932)

В нашей стране в 1920—1930-е годы постоянно переводились многие классические труды американского ученого, например, его известная книга «Теория гена» (рис. 2).



Рис. 2. Переводное издание книги Т.Х. Моргана «Теория гена». Л.: «Сятедь», 1927

Опубликованы также переводы его работ: Структурные основы наследственности. М.-Пг., 1924; Теория эволюции в современном освещении. М.-Л., 1926; Экспериментальные основы эволюции. М.-Л., 1936; Развитие и наследственность. М.-Л., 1937; Избранные работы по генетике. М.-Л., 1937.

100 лет со дня рождения М. Уилкинса

Морис Уилкинс (1916—2004), крупный английский биофизик. В начале своей карьеры занимался прикладными проблемами, в том числе совершенствованием радаров и созданием атомного оружия (участие в Манхэттенском проекте). Затем обратился к вопросам кристаллографии, включая рентгеноструктурный анализ строения молекул. Вместе с Дж. Уотсоном и Ф. Криком принимал участие в расшифровке структуры ДНК, за что все трое были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1962 году (в своей Нобелевской лекции он освещает предысторию этого открытия и последующую работу в данном направлении). Обстоятельства своей научной и личной жизни изложил в автобиографии «Третий человек Двойной спирали» («The Third Man of the Double Helix»), опубликованной

в 2003 году, за год до смерти в возрасте 88 лет (имеется на сайте www.twirpx.com/file/1405725).

100 лет со дня рождения Жана Доссе

Жан Доссе (1916–2009) — известный французский иммунолог. В 1958 году он впервые описал и охарактеризовал антиген лейкоцитов. В 1965 г. он вместе с Р. Ivanуi и D. Ivanуi описал антигенную систему лейкоцитов под названием HУ-L, которой затем дали наименование HLA (Human Leucocyte Antigens). Впоследствии это привело к определению Главного комплекса гистосовместимости (Major histocompatibility complex — MHC). Вся совокупность его открытий получила признание мировой научной общественности, и в 1980 году он был удостоен Нобелевской премии «за открытия, касающиеся генетически детерминированных структур на клеточной поверхности, регулирующих иммунологические реакции» (совместно с Дж.Д. Снеллом и Б. Бенасеррафом).

90 лет со дня рождения Пола Берга

Пол Берг относится к числу наиболее выдающихся исследователей, которые создавали фундамент современной молекулярной биологии, причем на ее решающих, переломных рубежах. Бергу было суждено дать ключ к будущей геной инженерии посредством создания рекомбинантных ДНК. Журнал откликнулся на его 80-летие («Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2006, Т. 2, № 4, с. 69–71»). Линия его жизни и научный вклад там достаточно полно прослежены. Остается добавить, что ученый жив, здравствует и участвует в научных и общественных событиях. Так, например, в 2010 году он опубликовал работу «Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology». В 2016 году он в числе 107 Нобелевских лауреатов обратился к организации «Гринпис», ООН и правительствам всего мира с призывом прекратить борьбу с ГМО.

Слово об учителе: к 80-летию Клауса Раевского

В этом году исполнилось 80 лет со дня рождения Клауса Раевского, авторитетного германского иммунолога и молекулярного биолога. Мне повезло в период своего формирования как научного работника трудиться под его руководством во время

зарубежной стажировки по стипендии имени А.П. Карпинского в начале 1980-х годов. Это было в Кельне, в университетской лаборатории генетики, которой руководил Раевский. Конечно, крайне импонировала в начале знакомства его звучная фамилия, известная всей России; к тому же на фоне западной усредненной, монотонной обстановки выделялись его тонкая интеллигентность и умение понять проблемы другого, независимо от ранга.

Действительно, принадлежит он к роду знатных дворян и прославленных воинов. Исторические изыскания связывают с именами Раевских города Новороссийск, Воронеж, Киев, не говоря уже о Бородинской битве. Все ближайшие родственники Клауса Раевского — отец, брат, сестра, сын Николаус — незаурядные ученые, проявившие себя в различных областях науки.



Как крупный специалист, он уже в те годы был признан в среде иммунологов. В настоящее время перечень его трудов еще более расширился и по разнообразию интересов, и по глубине изучения: обстоятельное исследование болезни Ходжкина, серия работ по В-клеткам, создание экспериментальной модели knock-out мышей и т.д. К. Раевский удостоен множества наград, в том числе премий Коха, Беринга — Китасато, Эйвери — Ландштейнера и др. В 2003 году был избран иностранным членом Российской академии наук. Сейчас он трудится в Берлине, в Центре Макса Дельбрюка по молекулярной медицине и также содержателен в общении и плодотворен в своей основной деятельности. Я бесконечно благодарен судьбе, что она свела меня со столь замечательным человеком.

Главный редактор журнала
профессор Р.Г. Василов

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 27.12.16
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0. 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