

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. 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. Василев* 4

Оригинальные статьи

Зависимость эффективности транскрипции гена гемолизина II *Bacillus cereus* от источника плазмы крови.
Ж.И. Андреева-Ковалевская, А.В. Сиунов, Ж.И. Бударина, А.М. Шадрин,
А.С. Нагель, А.С. Солонин 5

Действие липосом разного липидного состава на кислородный взрыв нейтрофилов человека.
Н.Ю. Лотош, А.Д. Москаленко, И.К. Малашенкова, Г.В. Казанова, В.А. Щелконогов,
Г.М. Сорокоумова, М.А. Ванцян, А.А. Селищева, Р.Г. Василев..... 13

Выделение почвенных стрептомицетов – продуцентов комплексных антибиотиков.
Ю.М. Поляк, В.И. Сухаревич..... 18

Характер изменения содержания хлорофилла и малонового диальдегида при различных условиях
культивирования водорослей.
Г.А. Даллакян 25

Биосинтез лимонной кислоты из глюкозосодержащих субстратов у дрожжей *Yarrowia lipolytica*.
Ю.Н. Лунина, С.В. Камзолова, В. Римович, А.В. Афонин, И.Г. Моргунов 30

Очистка пероксидазы хрена адсорбционной хроматографией.
С.И. Евсегнеев, В.И. Суровцев, В.М. Борзенков, Ю.И. Хатюшин, П.С. Акимов 38

Исследование влияния преобразованного солнечного света на доимплантационное развитие эмбрионов
мышы *in vitro*.
А.С. Чернов, Д.А. Решетников, А.А. Манохин, С.В. Гудков, Р.Н. Храмов 42

Медиаторный биосенсор на основе микроорганизмов активного ила для экспресс-определения
низких значений БПК₅.
А.С. Зайцева, В.А. Арляпов, А.Н. Решетилев..... 50

Применение различных антигенов микобактерий туберкулеза в гидрозольных препаратах для
экспрессной иммунодиагностики.
А.Г. Мешандин, В.С. Болдырев 58

Обзоры

Применение импедансной спектроскопии для исследования характеристик биосенсоров и биотопливных
элементов.
С.Е. Тарасов, Ю.В. Плеханова, А.Н. Решетилев 63

Страницы истории

Юбилейные и знаменательные даты 2017 года 72

Хроника

События первой половины 2017 года 75

Информация

Предстоящие мероприятия 2017 года 77

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Dependence of the transcription efficiency of the gene for *Bacillus cereus* hemolysin II on source of blood plasma.
Zh.I. Andreeva-Kovalevskaya, A.V. Siunov, Zh.I. Budarina, A.M. Shadrin,

A.S. Nagel, A.S. Solonin 5

The effect of liposomes of different lipid composition on the oxidative burst of human neutrophils.
N.Yu. Lotosh, A.D. Moskalenko, I.K. Malashenkova, G.V. Kazanova, V.A. Shchelkonogov,
G.M. Sorokoumova, M.A. Vantsyan, A.A. Selischeva, R.G. Vasilov 13

Isolation of soil *Streptomyces* producing complex antibiotics.
Y.M. Polyak, V.I. Sukharevich 18

The nature of the change in the content of chlorophyll and malonic dialdehyde under different conditions
for the cultivation of algae.
G.A. Dallakyan 25

Biosynthesis of citric acid from glucose-containing wood hydrolysates by the yeast *Yarrowia lipolytica*.
J.N. Lunina, S.V. Kamzolova, W. Rymowicz, A.V. Aforin, I.G. Morgunov 30

Purification of horseradish peroxidase with adsorption chromatography.
S.I. Evsegneevev, V.I. Surovtsev, V.M. Borzenkov, Y.I. Khatyuchin, P.S. Akimov 38

Influence of the artificial transformed sunlight on the preimplantation mouse embryos development
in vitro.
A.S. Chernov, D.A. Reshetnikov, A.A. Manohin, A.V. Gudkov, R.N. Khramov 42

Mediator biosensor based on microorganisms of activated sludge for rapid determination
of low BOD₅ values.
A.S. Zaitseva, V.A. Arlyapov, A.N. Reshetilov 50

The use of various antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in hydrosol preparations for rapid
immunodiagnosics.
A.G. Meshandin, V.S. Boldyrev 58

Reviews

The use of impedance spectroscopy to study the characteristics of biosensors
and biofuel elements.
S.E. Tarasov, Yu.V. Plekhanova, A.N. Reshetilov 63

Pages of history

Anniversary and significant dates 2017 72

The chronicle

Events of the first half-year 2017 75

Информация

Forthcoming actions 2017 77

Rules for authors 78

К читателям

Первый номер журнала за 2017 год содержит ряд работ, носящих как фундаментальный, так и прикладной характер.

В исследовании Ж.И. Андреевой-Ковалевской с коллегами из Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН «Зависимость эффективности гена гемолизина II *Bacillus cereus* от источника плазмы крови» решены преемственные задачи, связанные с установлением факта, что плазма крови человека содержит индуктор гемолизина II.

Группа сотрудников (Лотош Н.Ю. и др.) из НИЦ «Курчатовский институт», биофака МГУ им. М.В. Ломоносова, Московского технологического университета представила данные о влиянии липосом разного липидного состава на кислородный взрыв нейтрофилов человека. Показано, что ингибирующий эффект электронеutralных и катионных липосом может быть обусловлен разными механизмами: в случае липоевой кислоты — антиоксидантными свойствами добавленного липидного компонента, в случае стеариламина — токсичностью данного липида и разрушением нейтрофилов.

В работе «Выделение почвенных стрептомицетов — продуцентов комплексных антибиотиков» (авторы: Ю.М. Поляк, В.И. Сухаревич, Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН) выявлено, что стрептомицеты с повышенной антибиотической активностью присутствуют в почвенных микробных сообществах и, по-видимому, оказывают влияние на их качественно-количественный состав.

Г.А. Даллакян, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, изучил вопрос о характере изменения содержания хлорофилла и малонового диальдегида при различных условиях культивирования водорослей.

В статье авторов Ю.Н. Луниной, С.В. Камзоловой, В. Римович, А.В. Афонина, И.Г. Моргунова из Пушкино, Москвы и Вроцлава (Польша) представлены материалы о биосинтезе лимонной кислоты из глюкозосодержащих субстратов в дрожжах *Yarrowia lipolytica*.

А.С. Зайцев с коллегами из Тульского государственного университета и Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН рассмотрели возможность использования различных медиаторных систем в БПК-биосенсорах на основе микроорганизмов активного ила.

Коллектив авторов (Чернов А.С. и др.) из НИЦ «Курчатовский институт» и ряда академических институтов Москвы и Пушкино изложил результаты своих исследований влияния преобразованного солнечного света на доимплантационное развитие эмбрионов мыши *in vitro*.

Сотрудники Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск Московской области) С.И. Евсегнеев и др. описали оригинальный способ очистки пероксидазы хрена для крупномасштабного получения фермента.

А.Г. Мешандин, В.С. Болдырев (Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана) дали краткое сообщение о собственном новом иммунохимическом методе гидрозольной агглютинации на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe_3O_4) для выявления специфических антител к возбудителям туберкулеза как в сыворотке крови, так и в капиллярной крови.

Наконец, в обзоре С.В. Тарасова, Ю.В. Плеханова, А.Н. Решетилова (ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино) представлены современные подходы к электрохимической регистрации процессов, происходящих в биосенсорах и биотопливных элементах, с помощью импедансной спектроскопии.

По традиции в первом номере помещен список юбилейных и знаменательных дат очередного года в биотехнологии и физико-химической биологии.

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

ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА ГЕМОЛИЗИНА II *BACILLUS CEREUS* ОТ ИСТОЧНИКА ПЛАЗМЫ КРОВИ

Ж.И. АНДРЕЕВА-КОВАЛЕВСКАЯ*, А.В. СИУНОВ, Ж.И. БУДАРИНА,
А.М. ШАДРИН, А.С. НАГЕЛЬ, А.С. СОЛОНИН

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино Московской области

Пороформирующий белок *Bacillus cereus* гемолизин II способен преодолевать гликокаликс эукариотических клеток и при попадании в русло крови атаковать основные элементы крови. Использование репортерного гена бета-галактозидазы под контролем *hlyII* промотора показало, что экспрессия гена *hlyII* увеличивается в присутствии плазмы крови разных животных в культуральной среде. Выявлена разница как в эффективности индукции транскрипции гена гемолизина II, так и в чувствительности эритроцитов в зависимости от их происхождения.

Ключевые слова: пороформирующие токсины, регуляция экспрессии гена, индуктор, эритроциты млекопитающих.

Введение

Патогенные бактерии вырабатывают широкий спектр веществ, как непосредственно повреждающих или убивающих клетки макро- и микроорганизмов, так и способствующих проникновению бактерий в организм хозяина вследствие преодоления его защитных систем. Среди многообразия таких веществ особое место занимают токсины, которые для многих бактерий являются основными факторами патогенности. Эти вещества играют главную роль в развитии инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями. Широко распространены представители бацилл цереусной группы. В эту группу входят семь видов бактерий, среди которых: *B. anthracis*, известный как опасный патоген, вызывающий сибирскую язву; *B. thuringiensis* — являющийся патогенным для насекомых; *B. cereus* — оппортунистический патоген, синтезирующий ряд токсинов, способствующих развитию инфекции.

B. cereus может вызывать пищевые отравления с диарейным и эметическим синдромами, а также заболевания глаз, нервной системы, маститы, сепсис, пневмонию, эндокардит, менингит, энцефалит и другие

болезни у человека [7]. Этот микроорганизм является одним из основных бактериальных загрязнителей продуктов питания, лекарственных и косметических препаратов, производимых промышленностью. Зарегистрирован случай выявления этих бацилл в жидкости для перевозки трансплантатов. *B. cereus* может образовывать споры и формировать биопленки [17, 21], что позволяет ей сопротивляться обычным процедурам очистки, используемым в пищевой промышленности, и поэтому *B. cereus* часто обнаруживается во многих необработанных и обработанных пищевых продуктах, таких как рис, специи, молоко, овощи, мясо, различные десерты [31]. Некоторые штаммы *B. cereus* содержат плазмиды, аналогичные плазмидам *Bacillus anthracis*, который вызывает сибирскую язву [20]. *B. cereus* способен противодействовать иммунной системе хозяина и существовать внутри своего хозяина. Показано, что вегетативные клетки *B. cereus* индуцируют гибель макрофагов [26]. *B. cereus* синтезирует металлопротеазу *InhA1*, которая разрушает антимикробные пептиды и наделяет споры *B. cereus* возможностью освобождаться из макрофагов [26]. Тем не менее мутант *B. cereus* с делетированным *inhA1* остается токсичным для макрофагов; это говорит о том, что другие факторы определяют токсичность *B. cereus*.

Ряд внеклеточных токсинов *B. cereus* обладает гемолитической активностью и рассматривается в качестве потенциальных факторов патогенности. *B. cereus* синтезирует много разнообразных токсинов, таких как цереолизин, сфингомиелиназа, цереолизин АВ, гемолизин ВL, гемолизин III и СутК. Один из цитолитических

© 2017 г. Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бударина Ж.И., Шадрин А.М., Нагель А.С., Солонин А.С.

* Автор для переписки:

Андреева-Ковалевская Жанна Ивановна
ст. н. с. лаборатории молекулярной микробиологии
Института биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино Московской области
E-mail: hemolysin6@gmail.com

порообразующих токсинов *B. cereus* — гемолизин II (HlyII) представляет особый интерес, потому что он является гомологом такого опасного токсина, как альфа-токсин *Staphylococcus aureus*. Более того, он характерен для цереусной группы бактерий, так как его ген был обнаружен в клетках *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* и *B. anthracis*. В геноме *B. anthracis* найден ген, структура которого повторяет структуру гена *hlyII* *B. cereus*, но содержит мутацию, приводящую к сбивке рамки считывания.

Гемолизин II был впервые описан и охарактеризован в нашей лаборатории [2]. Ген гемолизина II был перенесен в клетки *E. coli* и *B. cereus*, в результате были сконструированы первые штаммы с повышенным синтезом этого белка, разработана схема его очистки и проведены базовые эксперименты по изучению его свойств [6]. Уже сейчас можно сказать, что свойства гемолизина II, несмотря на очевидное структурное сходство с белками этого класса, существенно отличаются от стафилококкового альфа-токсина. В частности, различаются электрофизиологические характеристики образуемого им канала [1, 5]. Это объясняется различным распределением заряженных аминокислотных остатков, боковые группы которых обращены внутрь канала. HlyII разрушает клетки эукариот путем формирования ионопроводящих нанопор в их мембранах, что приводит к лизису этих клеток. Гемолизин II участвует в патогенезе и способен убивать макроорганизмы, такие как дафнии, рыбы, харовые водоросли [22, 30, 32]. Недавно французскими учеными было проверено 57 штаммов *B. cereus*, выделенных из разных источников, и они показали, что все патогенные штаммы обладали геном гемолизина II, тогда как в непатогенных штаммах этого гена не было обнаружено [9].

Следовательно, гемолизин II является одним из основных факторов патогенности в развитии заболеваний, вызываемых *B. cereus*. Транскрипция гена *hlyII* строго контролируется на уровне ее инициации, по крайней мере, двумя белками: HlyIIR и глобальным транскрипционным регулятором Fur, последний из которых также вовлечен в регуляцию продукции нескольких других факторов патогенности [16, 25, 29, 34]. Гемолизин II не регулируется глобальным регулятором PIsR, как большинство энтеротоксинов цереусной группы микроорганизмов. Ген регулятора *hlyIIR* расположен на расстоянии около 300 пн, непосредственно за геном *hlyII* [8]. HlyIIR имеет высокую степень идентичности с ДНК-связывающими транскрипционными регуляторами семейства TetR/AcrR. Гены гемолизина

II и его регулятора широко распространены среди представителей цереусной группы и встречаются всегда совместно друг с другом. Ген *hlyIIR* способен кодировать белковый продукт, состоящий из 201 аминокислотного остатка. Молекулярная масса данного белка (HlyIIR), соответственно, равна 22,11 кДа. Белок HlyIIR находится в растворе в виде димера, и два HlyIIR димера независимо связываются с инвертированными повторами (44 bp) операторной области гена гемолизина II [27]. N-концевой домен HlyIIR содержит альфа2 и альфа3 спирали, которые формируют типичный спираль-поворот-спираль ДНК-связывающий мотив. Установленный в структуре регуляторного белка гидрофобный «карман» указывает на возможность взаимодействия HlyIIR с низкомолекулярным лигандом [23]. Изучение микробных генетических элементов, функционирование которых связано с попаданием бактерий в макроорганизм, является чрезвычайно важным для понимания основ инфекционного процесса. Для ряда болезнетворных микробов показано, что экспрессия многих генов, ответственных за патогенность, регулируется небольшими молекулами, свободно проникающими внутрь клетки. Эти молекулы несут информацию о наличии или отсутствии в окружающей среде тех или иных питательных веществ, изменении pH или окислительно-восстановительных условий. Например, присутствие железа в среде обитания приводит к блокировке экспрессии ряда факторов патогенности, а снижение концентрации свободных ионов железа обеспечивает их эффективный синтез [16, 25, 29, 34].

Таким образом, экспрессия *hlyII* контролируется несколькими транскрипционными факторами, которые репрессируют экспрессию гена токсина. Однако о том, как активируется экспрессия *hlyII*, ничего не известно. Главным инструментом бактерий, широко используемым для этой цели, являются пороформируемые токсины, которые, образуя в мембранах окружающих клеток поры, нарушают их целостность и позволяют бактериальным клеткам использовать различные питательные вещества. Основной пороформирующий белок *Bacillus cereus* гемолизин II способен преодолевать гликокаликс эукариотных клеток [3], и в связи с этим выяснение его поведения при попадании в русло крови, включающее в себя способность атаки основных элементов крови и эффективность синтеза HlyII бактериями, является актуальной задачей.

В данной статье мы изучали влияние плазмы крови разных животных на уровень экспрессии гена пороформирующего токсина HlyII в клетках *B. cereus*. Кроме

того, был проведен анализ чувствительности эритроцитов, выделенных из крови этих животных.

Цель исследования состоит в сравнительном анализе эффективности экспрессии гена гемолизина II *B. cereus* в присутствии компонентов плазмы крови различных млекопитающих и эффективности атаки эритроцитов этих животных.

Материалы и методы

Определение гемолитической активности. Во всех экспериментах использовали очищенный белок HlyII, выделенный из *E. coli* Z85 (содержит плазмиду pUJ2, которая несет ген гемолизина II из штамма *B. cereus* В-771), как описано ранее [6]. Гомогенность белка HlyII (99%) определяли электрофоретически, очищенные препараты хранили (концентрация 20 мкг/мл) в 20 mM калий-фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 40 mM NaCl и 10% глицерина, при -20 °С. Белок HlyII имел удельную активность 400 ГЕ (гемолитических единиц) на мкг белка.

Гемолитическую активность на эритроцитах разных животных определяли по методу, основанному на спектрофотометрической регистрации гемоглобина, высвобождающегося при лизисе эритроцитов [6]. Для приготовления суспензии эритроцитов конечной концентрации 1% и разбавления тестируемых образцов использовали 74 mM Na-фосфатный буфер (рН 6,8), содержащий 77 mM NaCl (ФсБ). В экспериментах по определению чувствительности эритроцитов к гемолизу II использовали 0,5% суспензии эритроцитов и обрабатывали их в течение 30 мин при 37 °С. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов без добавления гемолизина и после осмотического шока водой. После 30 мин инкубации суспензии центрифугировали в течение 1 мин и измеряли оптическую плотность супернатанта при длине волны 541 нм. За единицу гемолитической активности (ГЕ) было принято количество гемолизина, вызывающего лизис половины клеток в 1,0 мл 0,5%-ной суспензии эритроцитов в ФсБ (рН 6,8) при 37 °С в течение 30 мин.

Бактериальные штаммы и условия их выращивания. В данной работе были использованы рекомбинантный штамм *B. cereus* 4342-Z, полученный путем трансформации *B. cereus* ATCC 4342 (штамм, родственной *B. cereus* В-771, www.atcc.org) плазмидой pHT304-18Z (плазида, несущая ген β -галактозидазы, без промоторной области [4]) и штамм *B. cereus* 4342-P771Z, полученный путем

трансформации *B. cereus* ATCC 4342 плазмидой pPH2Z-B771 (pHT304-18Z с *hlyII* промоторной областью из *B. cereus* 771 [29]). Клетки *B. cereus* трансформировали при помощи электропорации. Рекомбинантные штаммы *B. cereus* выращивали при 37 °С на среде LB, либо на плазме крови с добавлением LB. Отбор клеток проводили на разных стадиях роста.

Тестирование β -галактозидазной активности. Измерение β -галактозидазной активности проводили в 96-луночном планшете NUNC Denmark на приборе multi-mode microplate reader Filter Max F5. Клетки *B. cereus* выращивали при 37 °С в течение 2 часов и отбирали в логарифмической фазе роста, при этом оптическая плотность была в районе 0,9 ОЕ. Затем ресуспендировали в Z-буфере с 0,1% лизоцимом и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Далее добавляли Triton X100. Реакцию с ONPG проводили при 30 °С и останавливали 1M Na₂CO₃; когда цвет проб становился желтым, записывали время реакции. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм для каждой пробы. Расчет β -галактозидазной активности проводили по формуле:

$$MU = (1000 \times OD_{405}) / (OD_{595} \times RT),$$

где RT — время реакции [12].

Результаты и обсуждение

Ранее нами были сконструированы рекомбинантные плазмиды, содержащие ген β -галактозидазы, транскрипционно слитый с промотором гена гемолизина II [29]. Эти конструкции (рис. 1) позволили быстро определять зависимость эффективности экспрессии гена гемолизина II от состава среды выращивания.

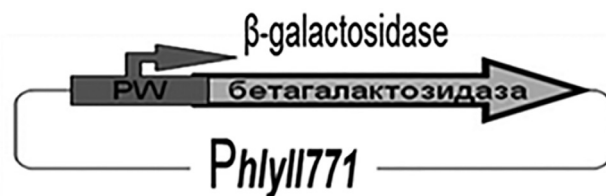


Рис. 1. Схема конструкции с репортерным геном бета-галактозидазы, находящимся под контролем промоторно-операторной области *hlyII* из *B. cereus* В-771

При переносе рекомбинантных плазмид в клетки *B. cereus* было найдено, что транскрипция с промотора гена гемолизина увеличивается в десятки раз в присутствии в культуральной среде плазмы крови. Полученный

результат дает возможность прийти к заключению, что плазма крови содержит индуктор, который может взаимодействовать с HlyII^R, напрямую изменяя его пространственную структуру, или может запускать некий механизм внутри клетки, приводящий к изменению его способности связываться с оператором, вследствие чего репрессор уже не может блокировать транскрипцию *hlyII*. Поэтому можно считать, что, попадая в макроорганизм, бактерии значительно увеличивают экспрессию гена *hlyII*, продукт которого вызывает лизис клеток, что обеспечивает бактериальные клетки питательными веществами.

Сравнительный анализ эффективности индукции экспрессии гена гемолизина в зависимости от источника плазмы продемонстрировал, что уровень экспрессии зависит от происхождения плазмы крови. В настоящей работе была использована плазма крови различных млекопитающих. Несмотря на то, что все исследованные образцы плазмы крови обеспечивают индукцию HlyII, наблюдали высокий уровень индукции этого токсина при выращивании рекомбинантных бактериальных

клеток в присутствии плазмы крови человека, крысы и свиньи, тогда как при использовании плазмы крови кролика уровень повышался незначительно (рис. 2). В связи с тем, что природа индуктора не определена, можно предположить, что уровень индукции транскрипции гена может зависеть от природы индуктора, возможно от степени его модификации, а также от его количества в среде выращивания микроорганизма. Необходимо помнить и о состоянии самого репрессора и его восприимчивости к индуктору. Например, степень его модификации (фосфорилирования), которая может зависеть также от состава среды выращивания. Однако к настоящему моменту мы не имеем информации о реальной природе индуктора, и поэтому все высказанные предположения возможны. Основным результатом, представляемым в выполненной работе, являются доказательства наличия индуктора во всех проверенных нами препаратах плазмы и различающаяся степень индукции гемолизина II при выращивании *B. cereus* в среде, содержащей компоненты плазмы крови разных млекопитающих.

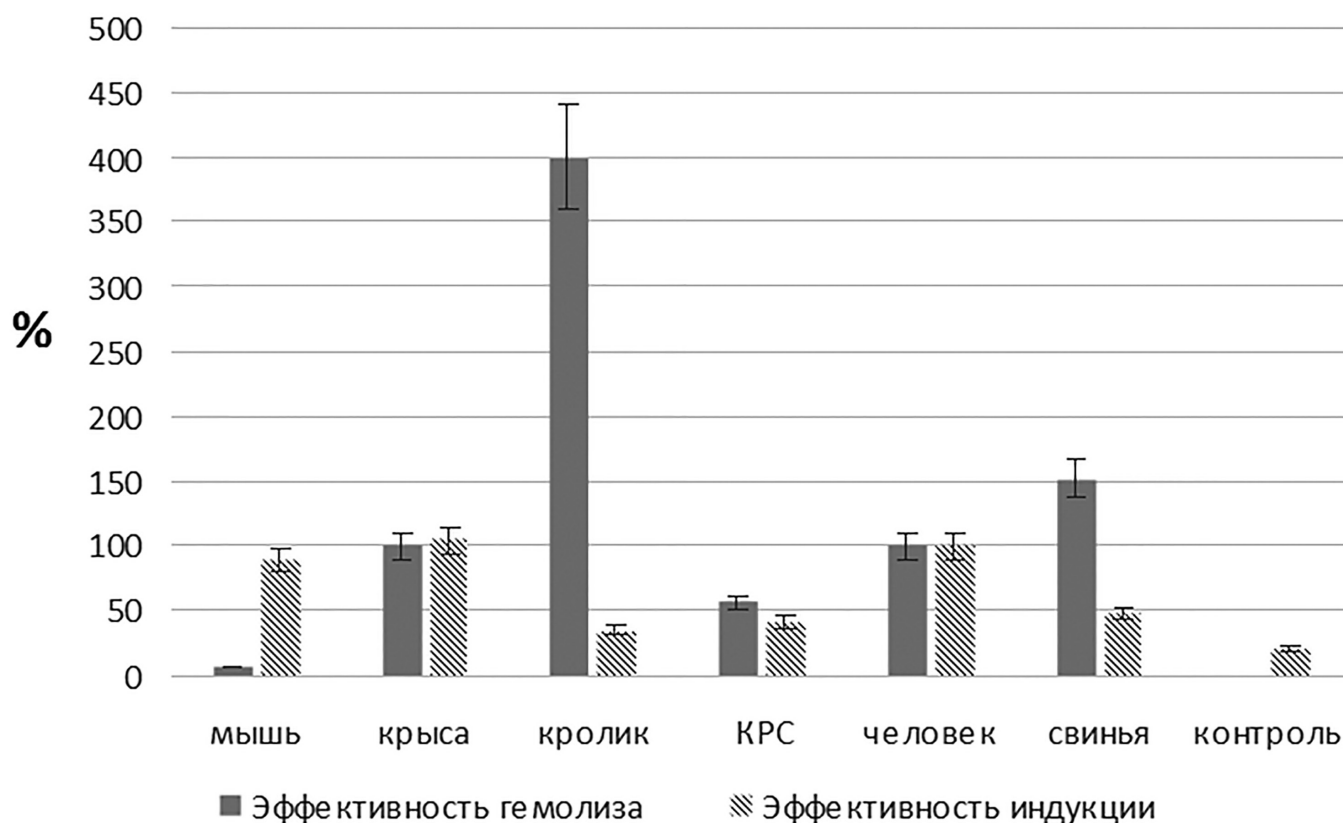


Рис. 2. Эффективность индукции транскрипции репортерного гена, находящегося под контролем промотора гена гемолизина II, в присутствии плазмы крови разных животных, и эффективность гемолиза эритроцитов разных животных при действии гемолизина II *B. cereus*. Уровни индукции и чувствительности эритроцитов показаны в процентах относительно данных, полученных на плазме крови и эритроцитах человека

Ранее нами выявлено, что эритроциты разных видов имели разную чувствительность к гемолизу II [3]. Одинаковые количества препарата гемолизина тестировали на 0,5% суспензиях эритроцитов. В идентичных условиях наиболее чувствительными к действию гемолизина II были кроличьи эритроциты, чувствительность свинных, крысиных и человеческих эритроцитов была сравнима, тогда как бычьи и мышьиные эритроциты — менее чувствительны (см. рис. 2). Величина связывания HlyII с мембранами эритроцитов оказалась более низкой (10 пМ), чем для α HL (1 нМ), то есть в целом чувствительность эритроцитов к действию HlyII более высокая.

Концентрация очищенного белка HlyII, при которой 50% человеческих эритроцитов разрушается за 30 мин, 2 нг/мл или 40 пМ, а для лизиса кроличьих эритроцитов достаточно 10 пМ. Чувствительность различных клеток к действию α -токсина *Staphylococcus aureus* (α HL) отличается на несколько порядков: так, для лизиса человеческих эритроцитов требуется 1 мкМ белка, а для лизиса кроличьих эритроцитов — 1 нМ. Степень восприимчивости эритроцитов к действию цитолитического токсина может являться свидетельством наличия (или отсутствия) в их мембранах специфических и неспецифических сайтов для воздействия цитолитических токсинов. Высокая чувствительность кроличьих эритроцитов к α HL, возможно, связана с взаимодействием со специфическим рецептором, потому что намного более высокие концентрации белка требуются для неспецифического связывания с искусственными бислойнными мембранами, как и в случае с человеческими эритроцитами [15], которые, по-видимому, не содержат специфического рецептора. Различная чувствительность разных эритроцитов к альфа-гемолизу обусловлена существованием на поверхности мембран эритроцитов кролика специфических белковых рецепторов, изначально связывающих токсин, локально повышая его концентрацию. Это позволяет токсину эффективно лизировать кроличьи красные кровяные клетки при низких концентрациях [10]. Для лизиса эритроцитов человека, лишенных специфических сайтов связывания или имеющих их в меньшем количестве, требуется гораздо более высокая концентрация указанного гемолизина. Связывание с мембраной в данном случае происходит посредством адсорбции, являясь неспецифическим (как при лизисе эритроцитов мыши или других видов, еще менее восприимчивых к действию альфа-гемолизина) [19].

Мембраны эритроцитов разных видов значительно отличаются друг от друга по фосфолипидному и белковому составу [11], что, возможно, также определяет

различную чувствительность этих клеток к действию цитолитических токсинов [18]. Неспецифическими мембранными сайтами связывания этого гемолизина являются фосфолипиды холинового типа, такие как сфингомиелин и фосфатидилхолин, процентное содержание которых в мембранах эритроцитов влияет на их чувствительность к действию α HL [33]. В то же время содержание в мембранах тестированных нами эритроцитов фосфатидилхолина для клеток кролика превышает в 2 и в 8 раз таковую для эритроцитов человека и быка, соответственно [11]. Следовательно, может проследиваться корреляция между содержанием в мембране фосфатидилхолина и чувствительностью эритроцитов к действию гемолизина II. Например, стафилококковому γ -гемолизу и лейкоцидину также необходимы фосфатидилхолиновые липиды для связывания [13]. На восприимчивости эритроцитов к альфа-токсину сказывается и содержание в их мембранах холестерина, влияющего на процесс формирования поры [33]. Альфа-токсин избегает взаимодействия с мембранами, богатыми такими липидами, как фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидилглицерин [14, 24]. Учитывая вышесказанное, разная восприимчивость эритроцитов различных видов животных к действию гемолизина II, возможно, обусловлена фосфолипидным составом их мембран. Однако сравнительный анализ влияния состава липидов в искусственных липосомальных мембранах продемонстрировал, что изменение концентрации холестерина от 0 до 50% не оказывало существенного влияния на пороформирующую активность гемолизина II. Кроме того, показано, что фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин и фосфатидилсерин, входящие в состав искусственных биологических мембран, практически не влияли на эффективность порообразования гемолизином II. Наши данные предполагают, что красные кровяные клетки не содержат специфического рецептора для гемолизина II, так как, несмотря на то, что эритроциты кролика, человека и быка проявляют заметную разницу в чувствительности к гемолизу II, эта разница не превышает десятикратной. Поэтому нет серьезных оснований говорить о том, что при лизисе кроличьих эритроцитов, которые продемонстрировали наибольшую чувствительность, имеет место некое специфическое связывание гемолизина II с высокоаффинными мембранными рецепторами. Тем не менее нельзя исключить возможность, что эти рецепторы, присутствующие в мембранах эритроцитов кролика, участвуют в связывании и гемолизина II. Однако, об-

ладая меньшим сродством к гемолизу II, чем к альфа-гемолизу, такие рецепторы могут обуславливать менее значительную разницу между чувствительностью этих клеток и эритроцитов человека.

Прежде чем гемолизин II достигнет липидного бислоя, происходит его взаимодействие с гликокаликсом, который защищает эритроциты, как и все эукариотические клетки, от внешних воздействий. Гемолизин II способен преодолевать этот барьер, однако уровень порообразования и, в конечном итоге, клеточный лизис, зависимый от гемолизина II, снижается от 5 до 10 раз [3]. Токсин внедряется в мембрану и изменяет конформацию белка и бислоюную архитектуру мембраны. То есть, невозможно исключить влияния гликокаликса на эффективность чувствительности эритроцитов разных животных.

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Компоненты плазмы крови животных индуцируют синтез гемолизина II.

2. Эффективность индукции экспрессии гена гемолизина II компонентами плазмы крови отличается при использовании плазмы разных млекопитающих.

3. При высокой чувствительности клеток эритроцитов отдельных видов млекопитающих к гемолизу II наблюдается снижение уровня индукции данного токсина в присутствии плазмы крови этих животных.

В целом, результаты анализа эффективности транскрипции с промотора гена *hlyII* позволяют прийти к заключению, что плазма крови человека содержит индуктор гемолизина II. Его присутствие обеспечивает высокий уровень гемолизина в крови животных при инфекции. Наличие высокой концентрации гемолизина необходимо бактериальным клеткам для получения питательных веществ за счет лизиса окружающих клеток животного. В идентичных условиях чувствительность эритроцитов разных видов животных была различна. Выявлена негативная корреляция между уровнем индукции HlyII и чувствительностью эритроцитов разных животных к HlyII: при высокой чувствительности животных клеток к гемолизу II наблюдается снижение индукции этого токсина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №15-34-20940 мол_а_вед.

Литература

1. Андреева-Ковалевская Ж.И., Солонин А.С., Синева Е.В., Терновский В.И. Пороформирующие белки и адаптация организмов к условиям окружающей среды // Успехи биологической химии. — 2008. — Т. 48. — С. 267–318.
2. Синева М.А., Бударина Ж.И., Гавриленко И.В., Томашевский А., Кузьмин Н.П. Доказательство существования гемолизина II из *Bacillus cereus*: клонирование генетической детерминанты гемолизина II // Молекулярная биология. — 1993. — Том. 27. — Вып. 6. — С. 1218–1222.
3. Холодков О.А., Бударина Ж.И., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Солонин А.С. Действие гемолизина II *Bacillus cereus* на клетки гепатоцитов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 51. — № 2. — С. 258–267.
4. Agaisse H., Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* // Mol. Microbiol. — 1994. — Vol. 13. — P. 97–107.
5. Andreeva Zh.I., Nesterenko V.F., Fomkina M.G., Ternovsky V.I., Suzina N.E., Bakulina A.Y., Solonin A.S. and Sineva E.V. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions // Biochimica et Biophysica Acta. — 2007. — Vol. 1768(2). — P. 253–263.
6. Andreeva Zh.I., Nesterenko V.F., Yurkov I.V., Bударина Z.I., Sineva E.V., Solonin A.S. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II // Protein Expression and Purification. — 2006. — Vol. 47. — P. 186–193.
7. Bottone E.J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen // Clin. Microbiol. Rev. — 2010. — Vol. 23(2). — P. 382–398.
8. Bударина Zh.I., Nikitin D.V., Zenkin N., Zakharova M., Semenova E., Shlyapnikov M.G., Rodikova E.A., Masyukova S., Ogarkov O., Baida G.E., Solonin A.S. and Severinov K. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II // Microbiology. — 2004. — Vol. 150(11). — P. 3691–3701.
9. Cadot C., Tran S.L., Vignaud M.L., De Buyser M.L., Kolsto A.B., Brisabois A., Nguyen C., Lereclus D., Guinebretiere M.H., Ramarao N.J. The InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains // Clin. Microbiol. — 2010. — Vol. 48. — P. 1358–1365.
10. Cassidy P., Harshman S. Studies on the binding of staphylococcal ¹²⁵I-labeled alpha-toxin to rabbit erythrocytes // Biochemistry. — 1976. — Vol. 15(11). — P. 2348–2355.
11. Crowell K.M., Lutz F. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin: the influence of sphingomyelin on binding and cation

- permeability increase in mammalian erythrocytes // *Toxicon*. – 1989. – Vol. 27(5). – P. 531–540.
12. Cutting S.M., Vander Horn P.B. Genetic analysis / In: C.R. Harwood, S.M. Cutting. *Molecular biological methods for Bacillus*. – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc. – 1990. – P. 27–74.
 13. Ferreras M., Höper F., Dalla Serra M., Colin D.A., Prévost G., Menestrina G. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1998. – Vol. 1414(1–2). – P. 108–126.
 14. Galdiero S., Gouaux E. High resolution crystallographic studies of alpha-hemolysin-phospholipid complexes define heptamer-lipid head group interactions: implication for understanding protein-lipid interactions // *Protein Sci*. – 2004. – Vol. 13(6). – P. 1503–1511.
 15. Gouaux E. α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An archetype of β -barrel, channel-forming toxins // *J. Struct. Biol*. – 1998. – Vol. 121(2). – P. 110–122.
 16. Guillemet E., Tran S.L., Cadot C., Rognan D., Lereclus D., Ramarao N. Glucose 6P binds and activates HlyIIR to repress *Bacillus cereus* hemolysin *hlyII* gene expression // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(2). – e55085. doi: 10.1371/journal.pone.0055085.
 17. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // *Cell. Microbiol*. – 2009. – Vol. 11(7). – P. 1034–1043. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.
 18. Hang'ombe M.B., Kohda T., Mukamoto M., Kozaki S. Relationship between *Clostridium septicum* alpha-toxin activity and binding to erythrocyte membranes // *J. Vet. Med. Sci*. – 2005. – Vol. 67(1). – P. 69–74.
 19. Hildebrand A., Pohl M., Bhakdi S. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells // *J. Biol. Chem*. – 1991. – Vol. 266(26). – P. 17195–17200.
 20. Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C.K., De B.K., Sacchi C.T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M.C., Priest F.G., Barker M., Jiang L., Cer R.Z., Rilstone J., Peterson S.N., Weyant R.S., Galloway D.R., Read T.D., Popovic T., Fraser C.M. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101(22). – P. 8449–8454.
 21. Hsueh Y., Somers E., Lereclus D. and Wong A.C. Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator // *Appl. Environ. Microbiol*. – 2006. – Vol. 72(7). – P. 5089–5092.
 22. Kataev A.A., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Solonin A.S., Ternovsky V.I. *Bacillus cereus* can attack the cell membranes of the alga *Chara corallina* by means of HlyII // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1818(5). – P. 1235–1241.
 23. Kovalevskiy O.V., Lebedev A.A., Surin A.K., Solonin A.S., Antson A.A. Crystal structure of *Bacillus cereus* HlyIIR, a transcriptional regulator of the gene for pore-forming toxin hemolysin II // *J. Mol. Biol*. – 2007. – Vol. 365. – P. 825–834.
 24. Menestrina G., Serra M.D., Prévost G. Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family // *Toxicon*. – 2001. – Vol. 39(11). – P. 1661–1672.
 25. Ramarao N., Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: A review // *Toxins (Basel)*. – 2013. – Vol. 5(6). – P. 1119–1139. doi: 10.3390/toxins5061119.
 26. Ramarao N. and Lereclus D. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages // *Cell. Microbiol*. – 2005. – Vol. 7(9). – P. 1357–1364.
 27. Rodikova E.A., Kovalevskiy O.V., Mayorov S.G., Budarina Zh.I., Marchenkov V.V., Melnik B.S., Leech A.P., Nikitin D.V., Shlyapnikov M.G., Solonin A.S. Two HlyIIR dimers bind to a long perfect inverted repeat in the operator of the hemolysin II gene from *Bacillus cereus* // *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581(6). – P. 1190–1196.
 28. Roseman S. Reflections on glycobiology // *J. Biol. Chem*. 2001. – Vol. 276(45). – P. 41527–41542.
 29. Sineva E., Shadrin A., Rodikova E.A., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Protsenko A.S., Mayorov S.G., Galaktionova D.Y., Magelky E., Solonin A.S. Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur // *J. Bacteriol*. – 2012. – Vol. 194(13). – P. 3327–3335.
 30. Sineva E.V., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Shadrin A.M., Gerasimov Y.L., Ternovsky V.I., Teplova V.V., Yurkova T.V., Solonin A.S. Expression of *Bacillus cereus* hemolysin II in *Bacillus subtilis* renders the bacteria pathogenic for the crustacean *Daphnia magna* // *FEMS Microbiol. Lett*. – 2009. – Vol. 299. – P. 110–119.
 31. Stenfors Arnesen L.P., Fagerlund A. and Granum P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins // *FEMS Microbiol. Rev*. – 2008. – Vol. 32(4). – P. 579–606.
 32. Teplova V.V., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Sineva E.V., and Solonin A.S. Quick assessment of cytotoxins effect on *Daphnia magna* using *in vivo* fluorescence microscopy // *Environ. Toxicol. Chem*. – 2010. – Vol. 29(6). – P. 1345–1348.
 33. Tomita T., Kamio Y. Molecular biology of the pore-forming cytolytins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. – 1997. – Vol. 61(4). – P. 565–572.
 34. Tran S.L., Guillemet E., Lereclus D., Ramarao N. Iron regulates *Bacillus thuringiensis* hemolysin *hlyII* gene expression during insect infection // *J. Invertebr. Pathol*. – 2013. – Vol. 113(3). – P. 205–208. doi: 10.1016/j.jip.2013.04.001.

DEPENDENCE OF THE TRANSCRIPTION EFFICIENCY OF THE GENE FOR *BACILLUS CEREUS* HEMOLYSIN II ON SOURCE OF BLOOD PLASMA

Zh.I. ANDREEVA-KOVALEVSKAYA, A.V. SIUNOV, Zh.I. BUDARINA,
A.M. SHADRIN, A.S. NAGEL, A.S. SOLONIN

*G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow region, Russia.*

Pore-forming protein of *Bacillus cereus* hemolysin II is able to overcome the glycocalyx of eukaryotic cells and in contact with the blood stream, to attack the main elements of blood. Use beta-galactosidase gene under the control of the *hlyII* promoter showed that the expression of *hlyII* gene is increased in the presence of blood plasma of different animals in the culture medium. It was identified the difference both in the efficiency of transcription induction of the gene for the hemolysin II and sensitivity of erythrocytes depending on their origin.

Keywords: pore-forming toxins, regulation of gene expression, inducer, red blood cells of mammals.

ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМ РАЗНОГО ЛИПИДНОГО СОСТАВА НА КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

Н.Ю. ЛОТОШ^{2*}, А.Д. МОСКАЛЕНКО¹, И.К. МАЛАШЕНКОВА¹, Г.В. КАЗАНОВА¹,
В.А. ЩЕЛКОНОГОВ³, Г.М. СОРОКОУМОВА³, М.А. ВАНЦЯН¹,
А.А. СЕЛИЩЕВА^{1,2}, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*

² *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,*

³ *Московский технологический университет*

Исследовали влияние липосом различного липидного состава, обладающих различным зарядом на мембране, на кислородный взрыв нейтрофилов, выделенных из цельной крови здоровых добровольцев. Использовали: электронейтральные (пустые) липосомы, состоящие из фосфатидилхолина; липосомы, содержащие кардиолипин (электроотрицательные) или стеариламин (электроположительные); липосомы, в состав которых входила антиоксидант липоевая кислота. Выделенные нейтрофилы предварительно инкубировали с липосомами в различной концентрации, затем активировали неопсонизированным зимозаном и измеряли параметры кислородного взрыва (максимальную интенсивность, площадь под кривой и время достижения максимальной интенсивности) с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. Выяснили, что входящая в состав липосом липоевая кислота снижает параметры кислородного взрыва, оказывая таким образом антиоксидантное действие; электронейтральные липосомы из фосфатидилхолина активируют кислородный взрыв; катионные липосомы, содержащие стеариламин, оказывают ингибирующий эффект, а анионные липосомы с кардиолипином не вызывают какого-либо эффекта.

Ключевые слова: липосомы, нейтрофилы, кислородный взрыв, человек.

Введение

Липосомы используются для направленной внутривенной, реже пероральной доставки лекарственных препаратов [10]. Их взаимодействие с разными типами клеток и липопротеинами крови может влиять как на фармакокинетику и эффективность действия лекарств, так и на функции клеток-мишеней. На основе липосом создано и утверждено FDA более 10 препаратов, в том числе и для лечения лейшманиоза, вызываемого внутриклеточными паразитами, поражающими макрофаги [5]. Механизм взаимодействия липосом с фагоцитами крови, в том числе с нейтрофилами, изучен фрагментарно и недостаточно.

Основная функция нейтрофилов заключается в защите организма от инфекций различной природы. Клетки распознают образ патогенности, двигаются к

месту локализации инфекции (бактерий, грибов, вирусов), фагоцитируют чужеродный объект, выделяют бактерицидные белки, протеолитические ферменты, активные формы кислорода (АФК) и цитокины [11]. Сравнительно недавно у нейтрофилов был открыт еще один противои инфекционный механизм — образование нейтрофильных экстраклеточных ДНК ловушек (NET) [6, 12, 13]. Формирование NET тесно связано с продукцией АФК, которые, как принято считать, вырабатывает НАДФН-оксидаза плазматической мембраны нейтрофилов [16].

Ранее было показано, что липосомы из фосфатидилхолина (ФХ) способны усиливать кислородный взрыв фагоцитов (макрофагов легких и моноцитов крови), индуцированный форболовым эфиром мирилата [2]. Позже методом флуоресцентной микроскопии была показана адсорбция липосом из ФХ на поверхности нейтрофилов [7]. Инкубация нейтрофилов перитонеальной жидкости с липосомами из фосфатидилсерина изменяла показатели кислородного взрыва, но наличие этого эффекта зависело от природы стимулирующего фактора [15].

Сверхмалые концентрации ганглиозидов модулировали кислородный взрыв макрофагов и нейтрофилов

© 2017 г. Лотош Н.Ю., Москаленко А.Д., Малашенкова И.К., Казанова Г.В., Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Ванцян М.А., Селищева А.А., Василев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Лотош Наталья Юрьевна

канд. хим. наук,

биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,

E-mail: natalotosh@gmail.com

человека [4], в то время как мицеллы ганглиозидов никак не влияли на интенсивность кислородного взрыва, а лишь удлиняли время достижения максимальной интенсивности хемилюминесценции [8]. Иными словами, не только состав, но и размер липидных частиц могут определять характер их воздействия на кислородный взрыв фагоцитов.

Настоящее исследование посвящено изучению влияния липосом разного липидного состава на кислородный взрыв нейтрофилов, активированных зимозаном. Кислородный взрыв регистрировали методом люминол-зависимой хемилюминесценции [1]. В работе использовали липосомы из фосфатидилхолина, а также липосомы из ФХ, содержащие антиоксидант липоевую кислоту (ЛК) или отрицательно заряженный фосфолипид — кардиолипин (КЛ), или положительно заряженный липид — стеариламин (СА).

Материалы и методы

В работе использовали следующие реагенты: фосфатидилхолин («Lipoid GmbH», Германия), липоевая кислота («Sigma—Aldrich», США), стеариламин («Sigma—Aldrich», США) и кардиолипин («Sigma—Aldrich», США), люминол и зимозан («ДИАЭМ», Россия).

Липосомы, использованные в эксперименте. Липосомы (суммарная концентрация липидов 40 мг/мл) получали методом экструзии в фосфатном буфере рН 7,4. В исследованиях использовали липосомы следующего состава: из ФХ; из смеси липидов ФХ/СА или ФХ/КЛ (9:1 по весу); из ФХ (40 мг/мл), содержащих 5 мг/мл ЛК.

Определение размеров (гидродинамического радиуса) и ζ -потенциала липосом. Диаметр липосом определяли методом динамического светорассеяния, электрокинетический потенциал ζ (дзета-потенциал) определяли методом электрофоретического рассеяния света (Zetasizer Nano, Malvern, Англия) при следующих условиях: показатель преломления был принят равным 1,590, показатель поглощения — 0,01. Температура инкубации 37 °С. При определении размера использовали липосомы в концентрации 1 мг/мл; для ζ -потенциала — 0,1 мг/мл. Для каждого образца проводили четыре измерения. Хранение растворов липосом при 4 °С в течение месяца не приводило к изменению их размеров.

Группа обследуемых (доноры). Обследуемая группа состояла из 17 практически здоровых добровольцев от 30 до 60 лет, которые предварительно дали

информированное согласие на участие в исследованиях. Критериями включения в группу являлись: отсутствие жалоб; нормальные значения показателей клинического анализа крови, в том числе СОЭ; лейкоцитарная формула крови; уровень С-реактивного белка.

Выделение нейтрофилов проводили из 3 мл гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола (1,077 и 1,119 г/см³) по известной методике [11]. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Получали 1–10×10⁶ кл/мл.

Кислородный взрыв нейтрофилов оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции с помощью хемилюминометра (Lum-1200, Россия) в присутствии люминола (0,28 мМ). Нейтрофилы (5–50×10⁴ клеток) и 100 мкл липосом в различной концентрации (0,2–2 мг/мл) предварительно инкубировали 10 мин при 37 °С, а затем клетки активировали неопсонизированным зимозаном (0,5 мг/мл), добавляя его непосредственно перед измерением. В качестве контроля клетки инкубировали с раствором Хенкса в тех же условиях. Учитывали следующие параметры кислородного взрыва, приведенные к одной клетке: максимальную интенсивность хемилюминесценции люминола (I_{\max} , мВ/кл), время достижения максимальной интенсивности (T_{\max} , мин) и интеграл (площадь под кривой, которую ограничивали временем достижения максимума, S_{\max} , мВ·с/кл).

Результаты

Характеристика липосом

В исследовании использовали большие однослойные липосомы из ФХ, состав которых модифицировали введением КЛ, СА и ЛК. Первые два соединения (КЛ и СА) полностью включаются в липидный бислой липосом. Включение ЛК в липосомы из ФХ зависит от соотношения фосфолипид/ЛК. Ранее было показано, что процент включения ЛК (5 мг/мл) в липосомы из ФХ (40 мг/мл) равен 85%, то есть липосомы содержат 4,25 мг/мл ЛК, а в водной фазе присутствует 0,75 мг/мл ЛК [3].

Диаметр (d, нм) липосом определяли по трем параметрам: интенсивности светорассеяния (I), количеству (N) и объемному (V) распределению частиц. Средний диаметр липосом указан в таблице 1. Видно, что липосомы разного состава имеют средний размер 150 нм. Определение ζ -потенциала показало, что липосомы из ФХ электронейтральны и их ζ -потенциал практически не отличается от нулевого. Как ни странно, введение 5 мг/мл ЛК не увеличивало отрицательный заряд на мембране, что, возможно, связано с глубоким погружением

липовой кислоты в толщу мембраны и экранированием ее заряда. Введение в состав липидов СА приводило к появлению положительного, а КЛ — отрицательного заряда (табл. 1).

Таблица 1
Средний диаметр липосом и их ζ -потенциал

Состав липосом	d, nm	ζ -потенциал, мВ
ФХ	144,2±37,6	-1,74±0,31
ФХ-ЛК	188,2±69,7	-3,09±0,37
ФХ-СА	160,0±29,3	+11,4±0,44
ФХ-КЛ	153,8±46,6	-11,09±1,11

Влияние липосом на интенсивность кислородного взрыва нейтрофилов

Клетки предварительно инкубировали с липосомами разного липидного состава или без них, а затем

активировали зимозаном; образовавшиеся АФК регистрировали по хемилюминесценции люминола. Количество нейтрофилов в кювете при измерении равнялось $5-50 \times 10^4$, концентрация липидов — 2 мг/мл. Следует отметить, что в отсутствие зимозана сами по себе липосомы из ФХ при инкубации с нейтрофилами не вызывают образования АФК (данные не приводятся). В таблице 2 представлены средние значения и стандартные отклонения регистрируемых показателей кислородного взрыва, рассчитанные на одну клетку. В этих условиях, то есть при концентрации липидов, равной 2 мг/мл, липосомы из ФХ активируют кислородный взрыв, липосомы с липовой кислотой его ингибируют, а липосомы из смеси ФХ/КЛ не оказывают какого-либо воздействия. В присутствии липосом из ФХ и смеси ФХ и КЛ время достижения максимума интенсивности оставалось практически постоянным, инкубация нейтрофилов с липосомами, содержащими ЛК, сопровождалась достоверным уменьшением времени достижения максимума.

Таблица 2
Средние значения и стандартные отклонения показателей кислородного взрыва нейтрофилов при активации зимозаном в присутствии липосом и в отсутствие липосом

Характеристика нейтрофилов	Количество добровольцев	I_{\max} , мВ/кл	S_{\max} , мВ/кл	T_{\max} , мин
Нейтрофилы, инкубированные в отсутствие липосом	17	1,66±1,25	1527±951	33±5,8
Нейтрофилы, инкубированные с липосомами из ФХ (2 мг/мл)	12	2,04±1,70*	1929±1579	30±3,4
Нейтрофилы, инкубированные с липосомами из ФХ-ЛК (2 мг/мл ФХ и 0,25 мг/мл ЛК)	4	0,26±0,14*	217±162*	24±5,1*
Нейтрофилы, инкубированные с липосомами из ФХ-КЛ (1,8 мг/мл ФХ и 0,2 мг/мл КЛ)	10	1,56±1,10	1839±1184	36±4,2

Примечание: * — показатели, которые имеют статистически достоверный уровень значимости $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента (при сравнении с теми же параметрами, полученными для контрольных образцов, инкубированных без липосом)

Активирующий эффект липосом из ФХ наблюдался в 70% случаев в группе из 12 пациентов разного пола и возраста, который достоверно усиливался при увеличении концентрации ФХ (рис. 1), а липосомы, содержащие КЛ, не влияли на интенсивность хемилюминесценции во всем диапазоне концентраций. Липосомы, содержащие ЛК, дозозависимым образом подавляли продукцию АФК, как это следует из рисунка 1.

Действие на кислородный взрыв нейтрофилов положительно заряженных липосом, содержащих СА, сложным образом зависело от концентрации, как это отражено на рисунке 2: сначала при увеличении концентрации СА уменьшалась интенсивность хемилюминес-

ценции при том, что сохранялась обычная форма кривой. При дальнейшем увеличении концентрации появлялся острый пик, а время достижения максимума варьировало в широких пределах от 5 до 120 мин. Надо отметить, что эффект липосом, содержащих СА, был отмечен для всех пациентов (7 человек). Ранее было показано резкое угнетение жизнеспособности нейтрофилов после инкубирования с катионными липосомами и усиление кислородного взрыва, в то время как электронейтральные липосомы не влияли на уровень кислородного взрыва. Авторы [9] считали, что обнаруженные эффекты являются следствием образования нейтрофильных экстраклеточных ловушек под действием катионных липосом.

Заключение

Обобщая результаты, можно отметить, что:

- дзета-потенциал липосом не влияет на характер действия липосом на кислородный взрыв нейтрофилов, так как и катионные (ФХ и СА), и электронейтральные липосомы (ФХ и ЛК) тормозят кислородный взрыв нейтрофилов, в то время как электронейтральные липосомы из ФХ его активируют;
- механизм действия липосом из ФХ, модифицированных липидами других классов, на кислородный взрыв нейтрофилов определяется свойствами добавленного компонента.

Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного центра оптической микроскопии и спектроскопии и Ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // Российский иммунологический журнал. — 2015. — Т. 9. — № 4. — С. 418–425.
2. Селищева А.А., Атруз О.М., Сорокоумова Г.М., Скрябин Г.А., Василенко И.А., Чучалин А.Г. Влияние липосом различного липидного состава на развитие кислородного взрыва в моноцитах крови и альвеолярных макрофагах человека // Биол. мембраны. — 2000. — Т. 17. — № 5. — С. 510–518.
3. Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Баранова О.А., Чеканов А.В., Клочкова А.В., Казаринов К.Д., Соловьева Э.Ю., Федин А.И., Швеу В.И. Липосомальная форма липоевой кислоты: получение и определение антиагрегационной и антиоксидантной активности // Биомедицинская химия. — 2016. — Т. 62. — Вып. 5. — С. 577–583.
4. Avrova N.F., Ivanova V.P., Tiurin V.A., Gamalei I.A., Kliubin I.V., Shchepetkin I.A., Borunov E.V., Tiurina I. [Modulation by super-low concentrations of ganglioside GM1 of oxidative burst in murine macrophages and human neutrophils] // Biull. Eksp. Biol. Med. — 1994. — Vol. 117(1). — P. 44–46.
5. Ben-Shimol S., Sagi O., Schwartz E., Greenberg D. Cutaneous leishmaniasis treated with ambisome (liposomal amphotericin B) // Harefuah. — 2012. — Vol. 151(8). — P. 458–460.
6. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., and Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // Science. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535.

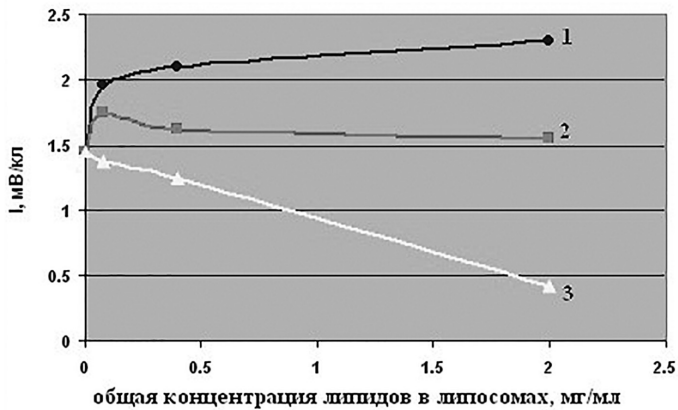


Рис. 1. Влияние суммарной концентрации липидов в препарате липосом разного липидного состава на интенсивность кислородного взрыва нейтрофилов (I). Обозначения: 1 — ФХ; 2 — ФХ-КЛ и 3 — ФХ-ЛК.

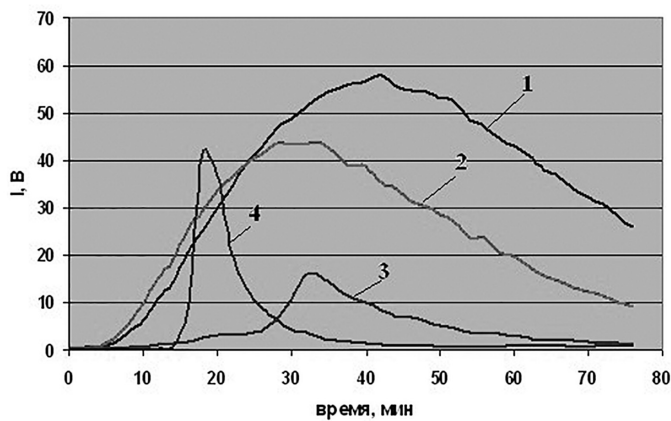


Рис. 2. Кривые хемилюминесценции, полученные при активации нейтрофилов зимозаном в присутствии липосом и в отсутствие липосом: 1 — без липосом; 2 — в присутствии ФХ-СА (концентрация липидов 0,08 мг/мл, ФХ 0,072 мг/мл, СА 0,008 мг/мл); 3 — в присутствии ФХ-СА (концентрация липидов 0,4 мг/мл, ФХ 0,36 мг/мл, СА 0,04 мг/мл); 4 — в присутствии ФХ-СА (концентрация липидов 2 мг/мл, ФХ 1,8 мг/мл, СА 0,2 мг/мл)

Ингибирующий эффект липосом из ФХ, содержащих ЛК, можно объяснить тем, что липоевая кислота, проникая в мембрану нейтрофилов, восстанавливается до дигидролипоевой кислоты, которая может, в свою очередь, поглощать активные формы кислорода и таким образом подавлять бактерицидную активность нейтрофилов [14].

Следовательно, ингибирующий эффект электронейтральных (ФХ и ЛК) и катионных (ФХ и СА) липосом может быть обусловлен разными механизмами: в случае ЛК — антиоксидантными свойствами добавленного липидного компонента; в случае СА — токсичностью данного липида и разрушением нейтрофилов.

7. *Değim Z., Değim T., Bas L., Elmas M.* The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in Kangal dogs and visualization of phagocytosis of liposomes // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – Vol. 61(2). – P. 246–251.
8. *Gavella M., Kveder M., Lipovac V.* Modulation of ROS production in human leukocytes by ganglioside micelles // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2010. – Vol. 43(10). – P. 942–949.
9. *Hwang T.L., Hsu C.Y., Aljuffali I.A., Chen C.H., Chang Y.T., Fang J.Y.* Cationic liposomes evoke proinflammatory mediator release and neutrophil extracellular traps (NETs) toward human neutrophils // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 2015. – Vol. 128. – P. 119–126. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.022.
10. *Mahallagam J., Nemunaitis J.S., Malik L., Sarantopoulos J., Weltman S., Saukhala K., Hart J., Kousba A., Callegos N., Andersen G., Charles J., Rogers J.M., Senzer N.N., Mita A.C.* Phase-I study of intravenously administered ATI-1123, a liposomal docetaxel formulation in patients with advanced solid tumor // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 74(10). – P. 1241–1250.
11. *Malech H.L., DeLeo F.R., Quinn M.T.* The role of neutrophils in the immune system: An overview / In: *Neutrophil Methods and Protocols.* Ed. by M.T. Quinn. – Humana Press, 2012. – P. 3–13.
12. *Pinegin B., Vorobjeva N.* Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmunity Reviews.* – 2015. – Vol. 14. – P. 633–640.
13. *Remijsen Q., Vanden Berghe T., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., De Rycke R., Noppen S., Delforge M., Willems J., Vandenabeele P.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation // *Cell Research.* – 2011. – Vol. 21(2). – P. 290–304.
14. *Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M.* Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 11(9). – P. 1135–1146.
15. *Takahashi M., Ikeda H., Sato E.F., Akimaru K., Edamatsu R., Inoue M., Utsumi K.* Stimulus-specific enhancement of luminol chemiluminescence in neutrophils by phosphatidylserine liposomes // *Arch. Biochemistry and Biophysics.* – 1992. – Vol. 298. – No. 1. – P. 43–48.
16. *Vorobjeva N.V., Pinegin B.V.* Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // *Immunobiology.* – 2016. – Vol. 221(2). – P. 208–219.

Список сокращений:

АФК – активные формы кислорода,

КЛ – кардиолипин,

ЛК – липоевая кислота,

СА – стеариламин,

ФХ – фосфатидилхолин.

THE EFFECT OF LIPOSOMES OF DIFFERENT LIPID COMPOSITION ON THE OXIDATIVE BURST OF HUMAN NEUTROPHILS

N.Yu. LOTOSH², A.D. MOSKALENKO¹, I.K. MALASHENKOVA¹, G.V. KAZANOVA¹,
V.A. SHCHELKONOGOV³, G.M. SOROKOUMOVA³, M.A. VANTSYAN¹,
A.A. SELISCHEVA^{1,2}, R.G. VASILOV¹

¹ National Research Centre «Kurchatov Institute»,

² M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,

³ Moscow Technological University

We researched here how liposomes of different composition and of different electric charge affect oxidative burst of neutrophils isolated from whole blood of healthy volunteers. Electrically neutral (empties) liposomes composed of phosphatidylcholine, electrically negative liposomes containing cardiolipin, electrically positive liposomes containing stearyl amine and liposomes containing an antioxidant, lipoic acid, were used. The isolated neutrophils were incubated with different concentrations of liposomes and subsequently activated with unopsonized zymozan. Characteristics of oxidative burst (maximal intensity, area under the curve, time before maximal intensity) were measured by luminol-dependent chemoluminescence. It was revealed that lipoic acid in the composition of liposomes decreased the oxidative burst, there by showing antioxidative activity. Electrically neutral liposomes with phosphatidylcholine activated the oxidative burst, cationic liposomes containing stearyl amine exerted inhibitory effect, and anionic liposomes containing cardiolipin did not give rise to.

Keywords: liposomes, neutrophils, oxidative burst, man.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ СТРЕПТОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ КОМПЛЕКСНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Ю.М. ПОЛЯК*, В.И. СУХАРЕВИЧ

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

Из почв разных типов выделены 280 культур актиномицетов, 55 из которых обладают антагонистическими свойствами. Наиболее высокую активность проявили стрептомицеты *Streptomyces* sp. P145 и *Streptomyces* sp. L22, образующие комплексные антимикробные антибиотики с антифунгальной и антибактериальной активностью. Высокий уровень антагонистической активности выявлен по отношению к грибам, широко распространенным в природе, в том числе, фитопатогенным — *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Botrytis cinerea* и др. Высокая антифунгальная активность изолятов обусловлена присутствием в комплексе полиеновых антибиотиков. Уровень антибиотической активности и соотношение полиеновых и неполиеновых антибиотиков в значительной степени зависят от состава среды и используемого источника углерода. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стрептомицеты с повышенной антибиотической активностью присутствуют в почвенных микробных сообществах и, по-видимому, оказывают влияние на их качественно-количественный состав.

Ключевые слова: *Streptomyces*, продуцент, антибиотики, почва, антагонистическая активность.

Введение

В последние годы микробиологический контроль фитопатогенов рассматривается как альтернатива химическим веществам, длительно применяемым в сельском хозяйстве, либо как дополнительный способ сокращения их использования [4, 8, 14, 23]. Микроорганизмы различных систематических групп — грибы, бактерии, актиномицеты, являются неисчерпаемым источником биологически активных веществ, которые могут быть использованы во многих сферах, в том числе и для решения проблемы защиты растений от фитопатогенов [6]. Регуляция взаимоотношений микроорганизмов по типу антагонизма может целенаправленно использоваться для снижения численности нежелательных популяций [15, 20].

В настоящее время известны отечественные и зарубежные средства биологической защиты растений — фитоспорин, бактофит, фитолавин, триходермин, Aspire, Biosave, Companion и др., однако в силу

того, что они не универсальны и часто не обладают необходимым спектром действия, их ассортимент оценивается как недостаточный [4]. Немаловажным является тот факт, что при изменении условий среды — резкие колебания влажности, температуры, радиации, содержания питательных веществ и многих других, типы отношений между микроорганизмами могут существенно меняться [5]. По мнению многих исследователей, этим и обусловлена необходимость поиска эффективных продуцентов с новыми антагонистическими свойствами [3, 15].

Среди метаболитов с антагонистической активностью, образуемых микроорганизмами, наиболее эффективными представляются антибиотики, а их наиболее перспективные продуценты — актиномицеты рода *Streptomyces* [5, 11]. Актиномицеты являются продуцентами большинства известных антибиотиков [18, 19]; при этом считается, что далеко не все типы антибиотиков, образующихся в почве, уже известны. Важно отметить, что актиномицеты — характерный представитель почвенных микробных комплексов, составляют значительную часть от общего числа бактерий [5].

Все вышеизложенное свидетельствует о целесообразности поиска среди актиномицетов эффективных антагонистов фитопатогенов, тем более, что, по сравнению с другими микроорганизмами, в этом аспекте они изучены недостаточно [12, 17]. Основной задачей настоящей работы был поиск почвенных стрептомицетов,

© 2017 г. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И.

* Автор для переписки:

Поляк Юлия Марковна

к.т.н., старший научный сотрудник,

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

197110 Санкт-Петербург, ул. Корпусная, 18

E-mail: yuliapolyak@mail.ru

синтезирующих комплексные антибиотики, обладающие антифунгальной и антибактериальной активностью.

Материалы и методы

Выделение и идентификация актиномицетов. Образцы почв, отобранные в разных регионах, в том числе в Ленинградской, Московской, Полтавской областях, на Южном Урале и др., были использованы для выделения актиномицетов, обладающих антагонистическими свойствами. Выделение актиномицетов проводили с использованием общепринятого метода посева на поверхность крахмало-аммиачного агара (КАА). Предварительную идентификацию изолятов осуществляли с использованием диагностических сред и методов по определителю Берджи [24] и определителю актиномицетов Гаузе с соавт. [2]. Изометрическую форму диаминопимелиновой кислоты (ДАП) клеточных стенок изолята определяли по методу Станека и Робертса [21]. Морфологию мицелия, спороносцев, поверхность спор изучали с применением сканирующей электронной микроскопии по методу Блэка [13] и просматривали в микроскопе JMS-35С (Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Культивирование в жидкой среде. Изоляты культивировали в глубинных условиях на среде № 10 следующего состава (г/л): соевая мука — 15, глюкоза — 15, глицерин — 5, крахмал — 5, натрий хлористый — 5, кальций углекислый — 1, рН 6,8–7,2; в течение 5 суток в колбах объемом 250 мл на качалке (240 об/мин) при 28 °С.

Рост актиномицетов контролировали по сухому весу. Предварительные сведения о продуцируемых выделенными актиномицетами антибиотиках получали при определении спектров поглощения экстрактов биомассы в ультрафиолетовом свете. Для этого биомассу изолятов, полученную после 5 суток культивирования, отделяли центрифугированием, промывали водой, после чего проводили экстракцию метанолом (в соотношении 1:3) при перемешивании на качалке (240 об/мин) в течение часа. Спектры поглощения метанольных экстрактов биомассы определяли в интервале длин волн 220–450 нм на спектрофотометре Genesys 10 UV Scanning (Thermo Spectronic, США).

Определение антибиотической активности. Антибиотическую активность и спектр биологического действия метанольных экстрактов биомассы определяли методом диффузии в агар на среде Чапека с крахмалом для грибов и на мясопептонном агаре (МПА) с 1%

глюкозы для бактерий и дрожжей [7]. В качестве тест-культур использовали фитопатогенные и токсигенные грибы *Aspergillus flavus* Link, *A. niger* van Tieghem, *A. terreus* Thom, *Botrytis cinerea* f. lini, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Penicillium funiculosum* Thom, *P. ochrochloron* Biourge, *P. granulatum* Bainier, *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, дрожжеподобные грибы *Candida albicans* Berkhout, *Candida utilis* (Henneberg) Lodder & Kreger, *Cryptococcus flavus* (Saito) Phaff & Fell, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Meyen et Hansen, бактерии *Bacillus mesentericus* Trevisan, *B. subtilis* Cohn, *Corynebacterium sepedonicum* Spieckermann & Kotthoff, *Proteus vulgaris* Hauser, *Pseudomonas syringae* van Hall, *Ps. fluorescens* Migula, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Зоны ингибирования роста измеряли после инкубации при температуре 28 °С в течение 5 суток для грибов и 2 суток для бактерий.

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

Результаты и обсуждение

При поиске продуцентов антибиотических веществ основной акцент был сделан на самую перспективную для этих целей группу микроорганизмов — актиномицеты. Из 280 культур актиномицетов, выделенных из почв разных типов, 55 изолятов (20%) проявили антибиотическую активность. Из их числа для последующей работы были выбраны два изолята, обладающие наиболее высокой антифунгальной и противобактериальной активностью — штамм L22, выделенный из дерново-карбонатной оподзоленной почвы (Rendzic Leptosols Eutric) Ленинградской области, и штамм P145, выделенный из чернозема типичного (Chernozem typical) Полтавской области.

На основании результатов, полученных при изучении морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков изолятов, а также с учетом наличия в их клеточных стенках LL-диаминопимелиновой кислоты обе культуры, согласно определителям Берджи [24] и Гаузе [2], отнесены к роду *Streptomyces*. Штамм L22 относится к видовой секции и серии *Helvolo-Flavus Helvolus*, штамм P145 — к секции и серии *Cinereus Achromogenes*.

Изучение антибиотической активности *Streptomyces* sp. P145 показало, что на среде № 10 культура проявляет высокую, главным образом, противогрибковую и противодрожжевую активность (табл. 1).

Спектры антимикробного действия *Streptomyces* sp. L22 и *Streptomyces* sp. P145

Тест-культуры		Зоны ингибирования роста, мм	
		<i>Streptomyces</i> sp. L22	<i>Streptomyces</i> sp. P145
Мицелиальные грибы	<i>Aspergillus niger</i>	30±2	20±1
	<i>Aspergillus flavus</i>	20±2	17±2
	<i>Aspergillus terreus</i>	18±1	23±1
	<i>Penicillium funiculosum</i>	19±2	16±1
	<i>Penicillium ochrochloron</i>	23±1	25±2
	<i>Penicillium granulatum</i>	31±2	27±2
	<i>Trichoderma viride</i>	38±2	28±3
	<i>Fusarium oxysporum</i>	36±3	29±2
	<i>Botrytis cinerea</i>	32±2	22±2
Дрожжеподобные грибы и дрожжи	<i>Candida utilis</i>	21±1	24±1
	<i>Candida albicans</i>	20±1	21±2
	<i>Cryptococcus flavus</i>	34±2	18±1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25±2	13±1
Гр ⁺ бактерии	<i>Bacillus mesentericus</i>	38±2	4±0
	<i>Bacillus subtilis</i>	30±2	5±0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	37±3	6±1
	<i>Corynebacterium sepeidonicum</i>	42±2	7±1
Гр ⁻ бактерии	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3±1	0
	<i>Pseudomonas syringae</i>	9±1	0
	<i>Proteus vulgaris</i>	30±2*	2±0

Примечание: * – бактериостатическое действие

Высокий уровень антагонистической активности (диаметр зоны ингибирования роста от 16 до 29 мм) отмечен в отношении всех исследованных тест-культур микромицетов и дрожжеподобных грибов. В наибольшей степени антифунгальная активность проявлялась против фитопатогенов *Penicillium granulatum*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum* (диаметр зоны ингибирования роста ≥ 27 мм). Антибактериальная активность *Streptomyces* sp. P145 проявлялась слабо (зоны ингибирования роста Гр⁺ бактерий 4–7 мм) или не проявлялась совсем (зоны ингибирования роста Гр⁻ бактерий р. *Pseudomonas* отсутствовали).

Еще более высокой антибиотической активностью по отношению ко всем исследованным группам микроорганизмов обладала другая отобранная культура *Streptomyces* sp. L22 (табл. 1). Высокая антифунгальная активность *Streptomyces* sp. L22 выявлена по отношению к грибам, широко распространенным в природе, в том числе, фитопатогенным – *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* и *Botrytis cinerea*. Зоны ингибирования роста грибов варьировали от 19 до 38 мм и в среднем (по 9 тест-культурам) составили 27 мм, что на 4 мм больше, чем средняя величина *Streptomyces* sp. P145.

Аналогичные результаты были получены и при использовании в качестве тест-культур дрожжей и бактерий. Так, для культуры *Streptomyces* sp. L22 зоны ингибирования роста Гр⁻ бактерий составили от 3 до 30 мм, в то время как для *Streptomyces* sp. P145 практически не оказывалось бактерицидного действия на данную группу бактерий (зоны ингибирования роста 0–2 мм). По отношению к Гр⁺ бактериям активность культуры *Streptomyces* sp. L22 была еще более высокой, зоны ингибирования роста варьировали в интервале 30–42 мм, и среднее значение (37 мм) превышало аналогичный показатель *Streptomyces* sp. P145 более, чем в 6 раз.

При изучении УФ спектров *Streptomyces* sp. L22 были выявлены 4 максимума поглощения метанольных экстрактов биомассы – при 323, 338, 356 и 443 нм (рис. 1). Максимумы при 323, 338, 356 нм характерны для полиенового антибиотика из группы пентаенов [1], что очевидно и обуславливает высокую антифунгальную активность изолята. Идентификацию другого компонента с максимумом поглощения 443 нм не проводили, так как она представляет собой самостоятельное исследование и не является целью настоящей работы.

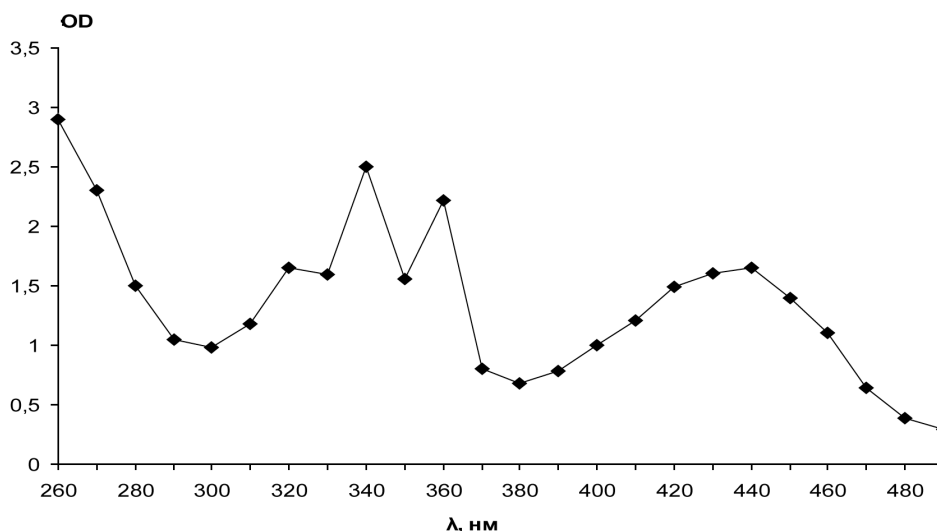


Рис. 1. УФ спектр метанольного экстракта биомассы *Streptomyces sp. L22*

Заслуживает внимания тот факт, что, помимо высокой антифунгальной активности, культура *Streptomyces sp. L22* проявляет и повышенную противобактериальную активность, то есть обладает свойствами эффективного антагониста. Другой особенностью изолята L22 является высокая скорость роста как на агаризованных средах, так и в глубинных условиях в жидкой среде (табл. 2).

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что при росте *Streptomyces sp. L22* в глубинных условиях максимальный прирост биомассы и максимальная антибиотическая активность наблюдаются уже через 3 сут. культивирования. Таким образом, выделенная из почвы культура *Streptomyces sp. L22* обладает свойствами эффективного антагониста, образуя комплексные анти-

биотики с высокой антифунгальной и антибактериальной активностью.

УФ спектр экстракта биомассы *Streptomyces sp. P145* свидетельствует о том, что культура образует не менее двух антибиотических веществ (рис. 2). Спектр поглощения одного из них с максимумами 362, 382, 404 нм характерен для полиенового антибиотика из группы гептаенов, отличающихся повышенной антифунгальной активностью [1]. Второй антибиотик в УФ свете имеет один пик с максимумом поглощения при 268 нм и иную химическую природу.

С целью определить, насколько устойчиво соотношение этих антибиотиков в комплексе, были проведены эксперименты по культивированию изолята P145 в условиях, различающихся по составу питательных сред (табл. 3).

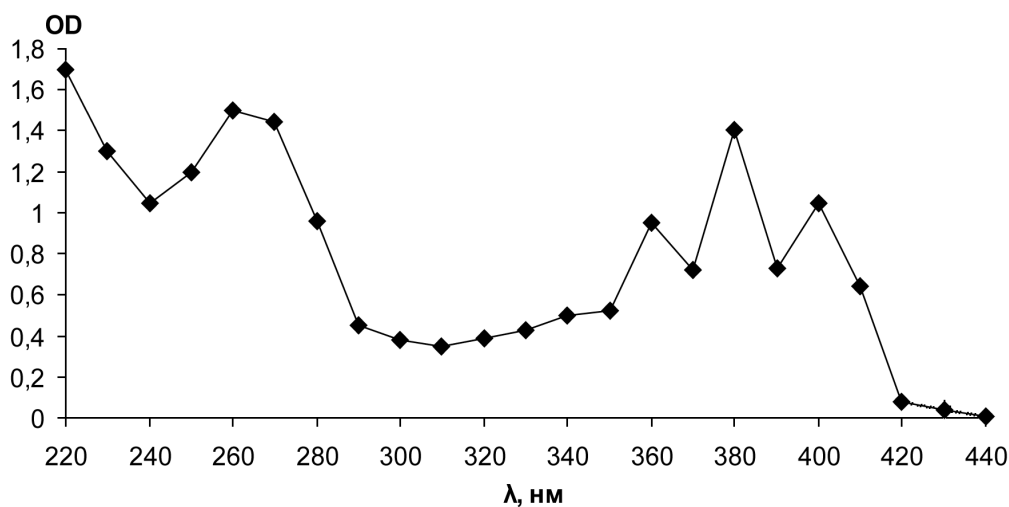


Рис. 2. УФ спектр поглощения метанольного экстракта биомассы *Streptomyces sp. P145*

Таблица 2

**Динамика роста и образования антибиотических веществ
культурой *Streptomyces* sp. L22 в глубинных условиях**

Время культивирования, сут.	Биомасса, г асб/л	Зоны ингибирования роста, мм			
		<i>A. niger</i>	<i>C. utilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
2	14,0±0,9	35±2	—	32±2	28±1
3	15,9±1,3	42±3	30±2	30±1	30±2
4	14,2±1,1	36±3	25±1	33±2	30±1
5	8,7±0,6	36±2	23±1	36±2	35±2

Таблица 3

Состав сред для биосинтеза антибиотиков культурой *Streptomyces* sp. P145

Компонент	Концентрация, г/л							
	№ 1	№ 3	№ 4	№ 5	№ 7	№ 8	№ 10	№ 11
Соевая мука	—	15	10	10	5	10	15	15
Кукурузная мука	—	5	20	—	—	5	—	—
Глюкоза	—	15	—	10	20	5	15	15
Крахмал	20	10	10	—	—	5	10	—
Глицерин	—	—	—	—	—	3	3	3
CaCO ₃	—	1	1	1	1	1	1	1
NH ₄ NO ₃	—	—	—	—	0,5	—	—	—
MgSO ₄	0,5	—	—	—	0,5	—	—	—
Na ₂ HPO ₄	—	—	—	—	—	0,1	—	—
NaNO ₃	3	—	—	—	—	—	—	—
NaCl	—	10	5	5	—	5	5	5
K ₂ HPO ₄	1	—	—	2	—	—	—	—
KCl	0,5	—	—	—	—	—	—	—

Таблица 4

**Параметры роста и антибиотическая активность *Streptomyces* sp. P145
при культивировании на различных по составу средах**

Среда	Биомасса, г асб/л	Зоны ингибирования роста, мм			Пики поглощения антибиотика при λ_{max}		Соотношение пиков при 268 и 382 нм
		<i>A. niger</i>	<i>C. utilis</i>	<i>B. subtilis</i>	268 нм	382 нм	
№ 1	3,2±0,4	0	0	0	0,04±0,03	0,02±0,01	—
№ 3	16,5±1,1	23±2	21±1	4±0	0,50±0,12	0,87±0,12	0,6
№ 4	8,2±0,6	0	0	0	0	0,02±0,01	—
№ 5	9,0±0,5	13±1	15±1	5±1	0,45±0,08	0,28±0,05	1,6
№ 7	9,2±0,7	16±1	15±1	7±1	0,45±0,16	0,23±0,04	1,9
№ 8	10,0±1,2	22±2	18±1	8±1	0,72±0,12	0,40±0,07	1,7
№ 10	14,2±1,6	23±1	19±2	6±1	0,67±0,15	0,50±0,11	1,3
№ 11	9,6±0,5	0	15±1	6±0	0,49±0,10	0,25±0,06	2,0

Как показали результаты исследований, прирост биомассы и антибиотическая активность культуры варьируют в зависимости от состава среды (табл. 4). Максимальный прирост биомассы (в абсолютной сухой биомассе — асб) — 16,5 и 14,2 г асб/л, получен на средах № 3 и 10, содержащих в качестве источника углерода глюкозу, крахмал и соевую муку; при этом глюкоза оказывает влияние не только на рост *Streptomyces* sp. P145, но и на образование антибиотических веществ. На средах без глюкозы (№ 1 и 4) синтез антибиотиков был подавлен, и антагонистические свойства культуры не проявлялись. Полученные результаты согласуются с данными Tarhan [22] и Vasavada [25] с соавт. об увеличении антибиотической активности представителей р. *Streptomyces* при использовании в качестве источника углерода глюкозы.

В зависимости от состава среды в значительной степени — от 0,6 до 2,0, изменяется не только уровень антибиотической активности, но и соотношение полиенового и полиеновых антибиотиков, определяемое как отношение оптических плотностей УФ при 268 и 382 нм. С увеличением этого показателя в экстрактах биомассы, полученных на средах № 5, 7 и 11, снижается противогрибковая активность при некотором повышении противобактериальной активности. Эти результаты подтверждают данные других авторов о влиянии разнообразных факторов среды на уровень антибиотической активности и типы отношений между микроорганизмами [5, 10, 16].

Заключение

Основным итогом настоящей работы явилось выделение из почв культур стрептомицетов *Streptomyces* sp. P145 и *Streptomyces* sp. L22, образующих комплексные антимикробные антибиотики. В составе антибиотических комплексов этих культур были определены полиеновые антибиотики, имеющие характерные максимумы поглощения в УФ свете и известные как наиболее эффективные антифунгальные антибиотики [1]. Очевидно, что именно они обуславливают высокую антифунгальную активность изолятов. Важным свойством полиенов является то, что к ним редко образуется резистентность или она развивается очень медленно [9]. Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что стрептомицеты с повышенной антибиотической активностью присутствуют в почвенных микробных сообществах и, по-видимому, оказывают влияние на их качественно-количественный состав. Эти результаты подтверждают и известное мнение о том, что именно актиномицеты

являются значительным источником антимикробных метаболитов — антибиотиков.

Литература

1. Ветлугина А.А., Никитина Е.Н. Противогрибковые полиеновые антибиотики. — Алма-Ата: Наука, 1980. — 322 с.
2. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. — М.: Наука, 1983. — 245 с.
3. Закалюкина Ю.В., Зенова Г.М. Антагонистические свойства почвенных ацидофильных актиномицетов // Изв. РАН. Сер. Биол. — 2007. — № 4. — С. 402–405.
4. Звенигородский В.И., Кузин А.И., Шагов Е.М., Азизбеян Р.Р., Зенова Г.М., Воейкова Т.А. Микробы-антагонисты (стрептомицеты и бациллы), выделенные из почв разных типов // Почвоведение. — 2004. — Т. 7. — С. 860–866.
5. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. — М: ГЕОС, 2001. — 256 с.
6. Новикова И.И., Литвиненко А.И., Бойкова И.В., Ярошенко В.А., Калько Г.В. Биологическая эффективность новых микробиологических препаратов Алиринов Б и С для защиты растений от болезней в разных природно-климатических зонах // Микология и фитопатология. — 2003. — Т. 37. — № 1. — С. 92–98.
7. Поляк М.С., Васильева Н.Г., Берштейн Е.М., Фрадкова Т.А. Определение биологической активности полиеновых антибиотиков: Методические указания. — Л.: ВНИТИАФ, 1979. — 38 с.
8. Свистова И.Д., Сенчакова Т.Ю. Экологическая пластичность грибов рода *Trichoderma* в черноземе выщелоченном // Почвоведение. — 2010. — № 3. — С. 342–348.
9. Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г. Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. — СПб: ЭЛБИ-СПб, 2009. — 208 с.
10. Яковлева Е.П., Борисова О.Г., Сухаревич М.Э. Влияние аэрации и окислительно-восстановительного потенциала на биосинтез противогрибкового антибиотика имбрицина // Антибиотики и химиотерапия. — 1998. — Т. 43. — № 3. — С. 3–7.
11. Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet. Mol. Biol. — 2012. — Vol. 35. — P. 1044–1051.
12. Berg G., Marten P., Minkwitz A., Bruckner S. Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424 // J. Plant Diseases and Protection. — 2001. — Vol. 108. — P. 1–10.
13. Black J.T. The scanning electron microscope. Operating principles / In: Hayat M.A. (ed.) Principles and techniques

- of scanning electron microscopy. Vol. 1. — New-York: Van Nostrand Reinhold Co, 1974. — P. 1–43.
14. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — Vol. 71(9). — P. 4951–4959.
 15. Costa F.G., Zucchi T.D., de Melo I.S. Biological control of phytopathogenic fungi by endophytic actinomycetes isolated from maize (*Zea mays* L.) // *Brazilian Archives of Biology and Technology.* — 2013. — Vol. 56(6). — P. 948–955.
 16. Duffy B.K., Défago G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — Vol. 65 (6). — P. 2429–2438.
 17. El-Tarabily K.A., Sivasithamparan K. Non-streptomycete actinomycete as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters // *Soil Biology and Biochemistry.* — 2006. — Vol. 38(7). — P. 1505–1520.
 18. Kekuda P., Shobha K., Onkarappa R. Fascinating diversity and potent biological activities of *Actinomycete* metabolites // *J. Pharmacy Res.* — 2010. — Vol. 3. — P. 250–256.
 19. Khanna M., Solanki R., Lal R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds // *Int. J. Adv. Biotech. Res.* — 2011. — Vol. 2(3). — P. 357–375.
 20. Lee J.Y., Hwang B.K. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea // *Can. J. Microbiol.* — 2002. — Vol. 48(5). — P. 407–417.
 21. Stanek J.L., Roberts G.D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography // *Appl. Microbiol.* — 1974. — Vol. 28. — P. 226–231.
 22. Tarhan, L., Kayal, H.A., Sazak, A., Sahin N. The correlations between TCA-glyoxalate metabolite and antibiotic production of *Streptomyces* sp. M4018 grown in glycerol, glucose, and starch mediums // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 164(3). — P. 318–337.
 23. Ulloa-Ogaz A.L., Muñoz-Castellanos L.N., Nevárez-Moorillón G.V. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control / In: *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs.* Méndez-Vilas A. (ed.). — Formatex, 2015. — P. 305–309.
 24. Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL / In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds.). Vol. 4. — Williams and Wilkins, Baltimore, 1989. — P. 2452–2492.
 25. Vasavada S.H, Thumar J.T, Singh S.P. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1 // *Curr. Sci.* — 2006. — Vol. 91(10). — P. 1393–1397.

Список сокращений:

МПА — мясопептонный агар,
 КАА — крахмало-аммиачный агар,
 ДАГГ — диаминопимелиновая кислота,
 УФ — ультрафиолетовый.

ISOLATION OF SOIL *STREPTOMYCES* PRODUCING COMPLEX ANTIBIOTICS

Y.M. POLYAK, V.I. SUKHAREVICH

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

From different soils samples 280 actinomycete isolates were obtained of which 55 were found to have antagonistic activity. The highest activity was recorded in *Streptomyces* sp. P145 and *Streptomyces* sp. L22 producing complex antibiotic, effective against bacteria and fungi. High level of antagonistic activity was recorded against phytopathogenic fungi — *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Botrytis cinerea*, et al. Polyene antibiotics were responsible for the high antifungal activity of isolates. The level of antibiotic activity and the ratio of polyene to nonpolyene antibiotics were strongly dependent on the composition of the medium and the carbon source. The results indicate that streptomycetes with enhanced antibiotic activity are common in soil microbial community and may influence on its qualitative and quantitative composition.

Keywords: *Streptomyces*, producer, antibiotics, soil, antagonistic activity.

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Г.А. ДАЛЛАКЯН*

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Показано, что эозин в концентрациях 7 мг/л подавляет на 60% рост и развитие водорослей, уменьшает содержание хлорофилла в 2 раза в клетках и скорость выделения кислорода в 2,5 раза по отношению к контролю. При этом увеличивается содержание малонового диальдегида — продукта перекисного окисления липидов. Однако в присутствии шунгита (100 г/л) в среде культивирования токсическое действие эозина инактивируется. Использование шунгита для очистки загрязненных водных экосистем, с нашей точки зрения, возможно, но предварительно необходимо проводить длительные лабораторные исследования влияния шунгита на другие водные организмы. Поскольку шунгит является сложным соединением и в его составе много различных веществ, одни концентрации шунгита могут инактивировать действие токсиканта и одновременно быть токсичными для более чувствительных гидробионтов.

Ключевые слова: водоросли, эозин, шунгит, хлорофилл, кислород, малоновый диальдегид.

Введение

В самоочищении водной среды и формировании качества воды большое значение имеет соотношение активных форм кислорода (АФК). Работы, посвященные АФК, отличаются тем, что одни авторы в своих работах важную роль придают гидроксильному радикалу, другие — перекиси водорода [10], третьи — супероксидному радикалу или синглетному кислороду [2]. Ряд исследователей считает, что одним из важных факторов, влияющих на рост и развитие обитателей водных экосистем, является окислительно-восстановительный потенциал среды [11]. Все эти работы не противоречат, а лишь дополняют наши представления о роли АФК. И в зависимости от экологического состояния водной среды роли отдельных форм АФК могут быть определяющими в формировании качества воды. Многие токсиканты как природного, так и антропогенного происхождения могут приводить к стрессу или гибели водных организмов. При этом механизмы их токсического действия на организмы различаются. Они могут снижать темп деления клеток,

эффективность фотосинтеза, усиливать окислительные процессы липидов, увеличивая количество малонового диальдегида (МДА) в клетках, а также влиять на другие жизненно важные процессы организма. АФК постоянно образуются в живой клетке и водоемах. Это — продукты нормального метаболизма кислорода, которые регулируются ферментативными процессами или антиоксидантами. Количество АФК в водоемах зависит от температуры воды, количества бактерий, фотосинтезирующих организмов и антропогенных факторов.

В настоящее время известно более 1000 веществ, обладающих свойствами генерировать АФК природного и антропогенного происхождения. Среди природных веществ фотосенсибилизаторами являются хлорофиллы, фикобилины, порфирины и промежуточные продукты их синтеза, ряд антибиотиков, хинин, рибофлавин и др. В водных экосистемах фотосенсибилизаторами являются некоторые экзометаболиты, а также вещества, попадающие в водную среду в результате лизиса клеток. Количество АФК может увеличиваться в водной среде в результате попадания туда промышленных отходов, таких как текстильной, фармакологической, лакокрасочной, косметической и других отраслей. В зависимости от физико-химических особенностей они могут очистить сточные воды или привести к летальному фотоокислению планктона в водоеме. В связи с этим возникает необходимость поиска новых, в том числе и универсальных способов инактивации этих соединений, действующих по разному механизму. Повреждающее

© 2017 г. Даллакян Г.А.

* **Автор для переписки:**

Даллакян Генарис Арменакович

канд. биол. наук, ст.н.с. кафедры гидробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: honaris@bk.ru

действие синглетного кислорода, образующегося в присутствии фотосенсибилизаторов, можно инактивировать с помощью шунгита [3].

Целью настоящей работы является показать, как изменяется рост культуры водорослей, хлорофилла *a*, содержание O_2 и перекисного окисления липидов в условиях культивирования водорослей с эозином и шунгитом.

Материалы и методы

Объектом исследования была альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda*. Ее выращивали в конических колбах объемом 300 мл на среде Тамия при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 14 мкмольквантов $m^{-2}c^{-1}$. Численность клеток подсчитывали в камере Горяева. Хлорофилл *a* выделяли 90%-ным ацетоном, концентрацию его определяли на спектрофотометре «Спекорд» UV-VIS. Содержание кислорода регистрировали на полярографе ПУ-1 закрытым электродом Кларка. Удельную активность выделения кислорода рассчитывали по ранее описанной методике [4]. Генератором синглетного кислорода служил фотосенсибилизатор эозин (динатриевая соль эозина $C_{20}H_8Br_4Na_2O_5$) в концентрации 7 мг/л. В качестве инактиватора синглетного кислорода использовали шунгит Зажогинского месторождения от компании «Арго» из расчета 100 г/л по методике, описанной в работе [5]. Краситель и шунгит добавляли в среду на 3-й день после посева культуры. Клетки водорослей отфильтровывали на мембранных фильтрах (диаметр пор 0,45 мкм) и разрушали ультразвуком в дезинтеграторе УЗДН-2. Скорость фотоокисления хлорофилла *a*, эозина определяли в областях их максимумов поглощения, соответственно: 450–560 нм, 350–560 нм. Содержание малонового диальдегида как продукта перекисного окисления липидов определяли с использованием 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с некоторыми модификациями. Клетки разрушали ультразвуком, добавляли 10 мл 0,1%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) из расчета на один грамм сухого вещества водорослей и центрифугировали 10 минут при 2000 г на центрифуге Т-24. После центрифугирования 1 мл надосадочной жидкости смешивали с 4 мл 0,5%-ного раствора ТБК в 20% растворе ТХУ и смесь инкубировали в кипящей воде в течение 30 минут, далее пробу охлаждали на ледяной бане для остановки реакции. Оптическую плотность комплекса МДА-ТБК определяли при 532 нм. [7]. Полученные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Образование синглетного кислорода в водных экосистемах происходит в основном за счет фотохимических реакций с участием сенсibiliзирующих красителей. Поглощение видимого света приводит к переходу молекулы фотосенсибилизатора (в нашем опыте эозина) в возбужденное синглетное состояние (1S). $S_0 + hv \rightarrow ^1S$. Молекулы, перешедшие в синглетное состояние, могут возвращаться в основное (S_0) или переходить в долгоживущее триплетное состояние (3S). Эозин в триплетном состоянии реагирует с O_2 и переводит его в возбужденное синглетное состояние. $^3S + O_2 \rightarrow S_0 + ^1O_2$. Далее синглетный кислород (1O_2) окисляет молекулу субстрата (Р). $P + ^1O_2 \rightarrow PO_2$.

Фотодинамический эффект обнаружен у всех живых организмов. В клетках растений синглетный кислород образуется в хлоропластах в результате взаимодействия молекулярного кислорода с хлорофиллом. Образование синглетного кислорода в клетках и механизм его участия в фотосинтезе интенсивно исследуется в работе [6]. АФК являются одним из важных факторов, отражающих энергетическое состояние клетки, и играют существенную роль при формировании качества питьевой воды. Эти реактивные молекулы непосредственно воздействуют на различные соединения, окисляя их, или создают условия для протекания различных биохимических процессов [2].

Наряду с «вредными» функциями АФК (повреждение белков, ДНК, перекисное окисление липидов и др.), новые исследования обнаруживают и их «полезные» функции. При активации разобщающих белков, регулирующих продукцию АТФ, и передаче сигналов роста [15], регуляции метаболизма ДНК митохондрий [13] АФК становятся не только патогенами, но и биорегуляторами [2]. На основании реакции с участием АФК в клетках различных организмов можно прогнозировать экологическое развитие окружающей среды [8]. Как способ очистки сточной и загрязненной питьевой воды используют фотодинамический эффект фотосенсибилизаторов [12]. Таким образом, при накоплении в пороговых концентрациях эндогенных или экзогенных АФК в случае загрязнения водной среды влияние на экосистему будет разнонаправленным. Неудивительно, что у клеток появилась сложная и достаточно эффективная система защиты от токсичности кислорода антиоксидантами (α -токоферол, β -каротин и др.) и различными ферментами (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и др.), дезактивирующими эти молекулы. Несмотря на

это неконтролируемое или несбалансированное образование АФК приводит к состоянию так называемого окислительного стресса, вызывающего гибель клетки. В связи с вышеперечисленными литературными данными становится крайне важным регулирование концентрации АФК не только в клетках организма, но и в водных экосистемах.

На рисунке 1 показано влияние 7 мг/л эозина и комбинированного действия шунгита и эозина на численность водорослей по отношению к контролю. Как видно из этого рисунка, численность водорослей снижается до 60% по сравнению с контролем начиная с 7-х суток роста культуры в присутствии эозина в среде (кривая 2). Однако при выращивании водорослей в присутствии эозина и шунгита в культуральной среде происходит частичная инактивация токсического действия эозина (кривая 3); при этом численность клеток уменьшается максимум на 20% по сравнению с контролем.

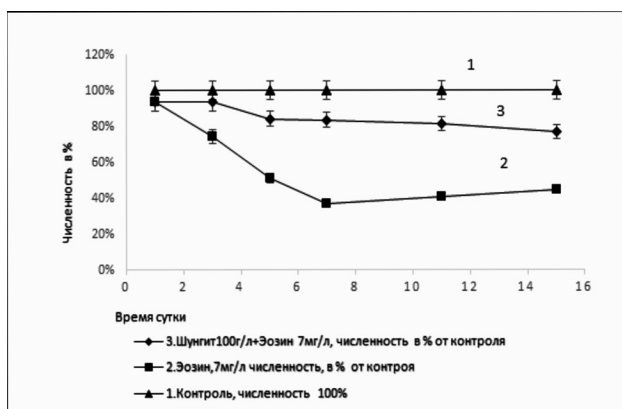


Рис.1. Изменение численности клеток водорослей по отношению к контролю в процентах

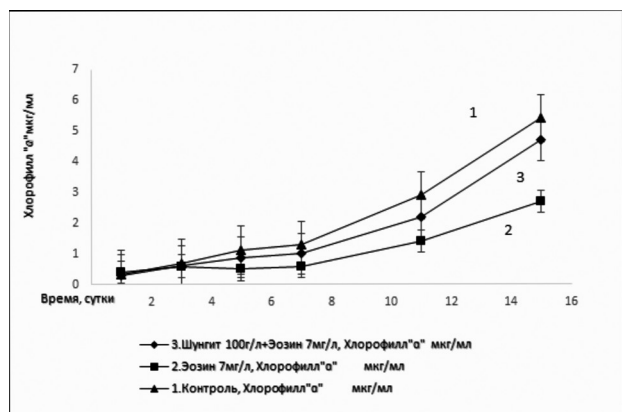


Рис. 2. Влияние эозина и шунгита на содержание хлорофилла

Как видно из рисунка 2, при культивировании водорослей в среде с эозином содержание хлорофил-

ла снижается, начиная с 5-х суток роста до двух раз (кривая 2), по сравнению с контрольными пробами. Образующийся синглетный кислород подавляет развитие водорослей (клетки становятся интенсивно розового цвета — это видно под микроскопом), разрушая фотосинтетический процесс в клетках (кривая 2). В присутствии одновременно в среде эозина и шунгита содержание хлорофилла в клетках водорослей сравнительно с контролем снижается частично до 20% (кривая 3). При выращивании в среде эозина с шунгитом происходит инактивация синглетного кислорода в основном до проникновения эозина в клетку, что видно под микроскопом: только часть клеток окрашена бледно-розовым цветом (кривая 3).

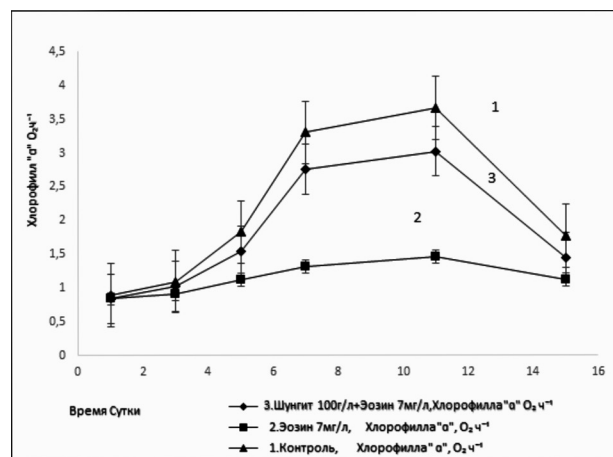


Рис. 3. Влияние эозина и шунгита на удельную активность выделения кислорода

Образующийся синглетный кислород от концентрации 7 мг/л эозина становится пороговым и подавляет все функциональные показатели клетки по сравнению с контролем (рис. 1, 2, 3). При 7 мг/л эозина клетки водорослей окрашиваются более интенсивным розовым цветом, когда концентрация ¹O₂ становится больше в клетках, то есть проявляется токсическое действие синглетного кислорода (кривая 2). При комбинированном действии эозина и шунгита токсическое влияние синглетного кислорода становится намного меньше (кривая 3). На 10-й день роста культуры выделение кислорода на единицу хлорофилла уменьшается по сравнению с контролем в 2,5 раза и в 1,2 раза, когда эозин и шунгит присутствуют в среде вместе (рис. 3). Синглетный кислород, генерируемый эозином на свету, может подавлять выделение кислорода, выводя из строя фотосистему II в хлоропластах [9]. Эти результаты согласуются с нашими опытами: мы наблюдаем резкое снижение удельной активности кислорода.

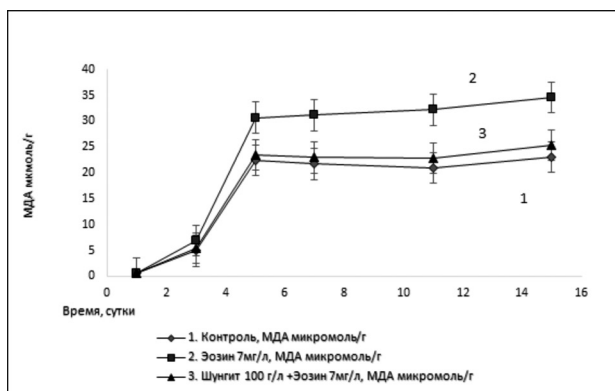


Рис. 4. Кинетика образования МДА в водорослях на 1 грамм сухого вещества при различных условиях среды культивирования

Перекисное окисление липидов и образование МДА подробно рассмотрено в работе [1]. Известно, что липиды являются одной из возможных мишеней для синглетного кислорода, что приводит к перекисидации липидов. Для проверки этого предположения определяли малоновый диальдегид как конечный продукт окисления липидов.

Как показано на рисунке 4, эозин в дозе 7 мг/л стимулирует образование МДА в клетках водорослей (кривая 2); при этом перекисидация липидов в случае присутствия шунгита в среде в некоторых точках находится в пределах статистической ошибки опыта.

На 7-, 11- и 15-й дни образование МДА продуктов в пробах с шунгитом больше, чем в контроле (кривая 3). Можно предположить, что относительное стимулирование перекисидации липидов связано с тем, что частично синглетный кислород проникает в клетку. Когда концентрация $^1\text{O}_2$ становится выше пороговой при 7 мг/л эозина без шунгита, наступает подавление всех физиологических параметров роста водорослей, содержания кислорода и хлорофилла. При этом резко увеличивается количество продуктов (МДА) перекисидации липидов.

Заключение

Чрезвычайно высокая химическая реактивность АФК позволяет им реагировать с разными структурными и функциональными компонентами клеток [16]. Следует при этом учитывать избыточную генерацию $^1\text{O}_2$, сопровождающуюся повреждением клеточного содержимого. Значительный интерес в этом аспекте представляют данные о том, что разные уровни АФК в клетках и водной среде могут вызывать разнонаправленное действие. В зависимости от соотношения различных форм АФК и их концентрации они могут оказать

токсическое или защитное действие на развитие водной среды. Поэтому поиск новых методов для регулирования содержания АФК с целью очистки водной среды становится актуальным.

В связи с вышесказанным был исследован защитный эффект шунгита на токсическое действие АФК во время развития водорослей. Показано, что эозин в концентрациях 7 мг/л подавляет рост культуры водорослей на 60%, в 2 раза меньше становится количество хлорофилла в клетках, удельная скорость выделения кислорода снижается в 2,5 раза по отношению к контролю. При этом увеличивается содержание малонового диальдегида как продукта перекисного окисления липидов. В присутствии шунгита 100 г/л в среде культивирования токсическое действие эозина инактивируется до 80%.

Использование шунгита для очистки загрязненных водных экосистем, как это предлагают некоторые исследователи, с нашей точки зрения, возможно, но предварительно необходимо проводить длительные лабораторные исследования влияния шунгита на другие гидробионты. Известно, что химический состав Жагогинской породы шунгита Карелии включает в себя кремний, алюминий, железо, магний, калий, серу, кальций, фосфор, фуллереноподобные вещества и др. [14]. По причине наличия в составе шунгита химически реактивных соединений одни концентрации шунгита могут инактивировать действие вредных веществ и одновременно быть токсичными для более чувствительных гидробионтов.

Литература

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972.— 252 с.
2. Воейков В.Л., Виленская Н.Д., До Минь Ха, Малышенко С.И., Буравлева Е.В., Яблонская О.И., Тимофеев К.Н. Устойчиво неравновесное состояние бикарбонатных водных систем // Журнал физической химии. — 2012. — Т. 86. — № 9. — С. 1518–1527.
3. Даллакян Г.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* // Вода: химия и экология. — 2013. — № 10. — С. 102–106.
4. Даллакян Г.А., Телитченко М.М., Агеева И.В., Погосян С.И. Ингибирование роста микроводорослей фотосенсибилизатором бенгальским розовым // Гидробиологический журнал, Киев. — 1991. — Т. 27. — № 2. — С. 49–52.
5. Даллакян Г.А. Эффективность фотосинтеза и удельная скорость прироста численности популяции микроводорослей при действии фотосенсибилизатора и шунгита // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии

- имени Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 4. — С. 21–25.
6. *Красновский А.А. мл.* Первичные механизмы фотоактивации молекулярного кислорода. История развития и современное состояние исследований // Биохимия. — 2007. — Т. 72. — № 10. — С. 1311–1329.
 7. *Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Еферова С.Г., Шевырева В.В.* Использование 2-тиобарбитуровой кислоты при исследовании перекисления липидов в тканях растений // Биологические науки. — 1978. — № 9. — С. 86–94.
 8. *Новиков К.В.* Роль активных форм кислорода в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды: автореф. на соискание ученой степени доктора биологических наук. — М., 2004.
 9. *Самуилов В.Д., Киселевский Д.Б., Синицын С.В., Шестаков А.А., Лагунова Е.М., Несов А.В.* H₂O₂ усиливает СN-индуцированный апоптоз в листьях гороха // Биохимия. — 2006. — Т. 71. — № 4. — С. 481–492.
 10. *Скурлатов Ю.И.* Определяющая роль окислительно-восстановительных процессов в формировании качества природной водной среды // Успехи химии. — 1991. — Т. 60. — № 3. — С. 575–580.
 11. *Штамм Е.В., Пурмаль А.П., Скурлатов Ю.И.* Роль пероксида водорода в природной водной среде // Успехи химии. — 1991. — Т. 60. — № 11. — С. 2373–2411.
 12. *Южакова О.А., Каляя О.Л., Лукьянец Е.А., Кузнецова Н.А., Уланова Л.А., Ворожцов Г.Н., Макаров Д.А., Красновский А.А., Ковалева М.А., Стрижаков А.А., Негримовский В.М.* Сенсibilизатор и способ фотообеззараживания воды. Патент РФ № 23753, кл. C07F7/28, дата подачи заявки 07.10.2008, дата публикации 10.12.2009.
 13. *Vaughman J.M., Mootha V.K.* Buffering mitochondrial DNA variation // Nature Genetics. — 2006. — Vol. 38. — No. 11. — P. 1232–1233.
 14. *Ignatov I., Mosin O.V.* The structure and composition of carbonaceous fullerene containing mineral shungite and microporos crystalline aluminosilicate mineral zeolite // Nanotechnology Research and Practice. — 2014. — Vol. 1. — No. 1. — P. 30–42.
 15. *Moreno-Loshuertos R., Acín-Pérez R., Fernández-Silva P. et al.* Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants // Nature Genetics. — 2006. — Vol. 38. — No. 11. — P. 1261–1268.
 16. *Voikov V.L.* Reactive Oxygen Species (ROS): Pathogens or sources of vital energy? Part 2. Bioenergetic and bioinformational functions of ROS // Journal of Alternative and Complementary Medicine. — 2006. — Vol. 12. — No. 3. — P. 265–270.

THE NATURE OF THE CHANGE IN THE CONTENT OF CHLOROPHYLL AND MALONIC DIALDEHYDE UNDER DIFFERENT CONDITIONS FOR THE CULTIVATION OF ALGAE

G.A. DALLAKYAN

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

It is shown that eosin at concentrations of 7 mg/l suppresses 60% growth and development of algae, reduces the chlorophyll content by 2 times in cells and diminished the rate of oxygen release 2.5 times with respect to control. At the same time, the content of malonic dialdehyde, a product of lipid peroxidation, increases. However, in the presence of schungite (100 g/l) in the culture medium, the toxic effect of eosin is inactivated. The use of schungite for the purification of contaminated aquatic ecosystems, from our point of view, is possible, but it is necessary to carry out long-term laboratory studies of the influence of schungite on other aquatic organisms. Since schungite is a complex compound and contains many different substances, some schungite concentrations can inactivate the action of the toxicant and at the same time be toxic to more sensitive hydrobionts.

Keywords: algae, eosin, schungite, chlorophyll, oxygen, malonic dialdehyde.

БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ У ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Ю.Н. ЛУНИНА¹, С.В. КАМЗОЛОВА¹, В. РИМОВИЧ², А.В. АФОНИН³, И.Г. МОРГУНОВ^{1*}

¹ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН»,
Пушино Московской области, Россия;

²Вроцлавский университет экологии и биологических наук, Вроцлав, Польша;

³АО «ГосНИИсинтезбелок», Москва, Россия

Изучен процесс биосинтеза лимонной кислоты (ЛК) из очищенной глюкозы и глюкозосодержащих гидролизатов древесины с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*. В условиях периодического режима в среде с очищенной глюкозой специально селекционированный мутант *Y. lipolytica* № 15 на 192 ч синтезировал 100 г/л ЛК с выходом продукта ($Y_{\text{ЛК}}$), равным 63%. Показано, что в периодическом режиме активное кислотообразование продолжается всего 4–5 суток. Причиной снижения кислотообразующей активности продуцента являлось ингибирование высокими концентрациями ЛК в среде культивирования кислотообразования. При применении отъемно-доливного метода активный биосинтез ЛК (68,1–69,3 г/л) продолжался в течение длительного времени (более 1250 ч). Установлена принципиальная возможность получения ЛК из глюкозосодержащих отходов гидролизатов опилок осины. Биомасса *Y. lipolytica* № 15 характеризуется высоким содержанием белка (22,65% от асб — абсолютной сухой биомассы) и незаменимых аминокислот: валина, изолейцина, лейцина, лизина, треонина, фенилаланина с тирозином, что указывает на высокую питательную ценность белка.

Ключевые слова: микробный синтез, дрожжи *Yarrowia lipolytica*, лимонная кислота, глюкоза, глюкозосодержащие отходы гидролизатов опилок осины.

Введение

Лимонная кислота (ЛК) — это соединение, которое находит широкое применение в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности [5, 8]. Расширяется использование этой кислоты в виде ее натриевой соли в составе моющих средств, где цитрат натрия успешно заменяет полифосфаты, являющиеся экологически опасными [6]; противоопухолевых препаратов, которые не имеют побочных эффектов; в качестве сополимера при производстве наноматериалов, которые используются в нанолечах [11]. В Евросоюзе биосинтетические органические кислоты, в том числе ЛК, рассматриваются в качестве перспективных средств защиты растений, которые эффективны в отношении

бактериальных и грибных фитопатогенов [3, 16]. ЛК, произведенная микробным синтезом, имеет статус GRAS (Generally Recognised as Safe) и относится к безопасным продуктам [13].

В настоящее время ЛК получают из свекловичной или тростниковой мелассы с использованием условно патогенных грибов *Aspergillus niger*. Содержание сахара в мелассе не превышает 50%, остальные 50% — это балластные вещества, которые не используются продуцентом и выбрасываются в окружающую среду. Также предусматривается обязательная обработка мелассы ферроцианидами для удаления избыточного содержания микроэлементов. Данный процесс производства ЛК является сложным и экологически небезопасным [5, 8].

Перспективными продуцентами ЛК служат дрожжи *Yarrowia lipolytica*; их удобно культивировать в глубинных условиях, процессы культивирования легко масштабируются и автоматизируются [5, 8, 13, 24]. В настоящее время разработаны высокоэффективные процессы получения ЛК с помощью природных, мутантных и рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* из различного сырья: для технических нужд — из *n*-алканов [5], для пищевых и медицинских

© 2017 г. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Римович В., Афонин А.В., Моргунов И.Г.

* Автор для переписки:

Моргунов Игорь Григорьевич

доктор биол. наук, заведующий лабораторией аэробного метаболизма микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

142290 Пушино, пр-т Науки, 5

E-mail: morgunovs@rambler.ru

целей — из глюкозы [9, 7, 12, 17, 22], глицерина [4, 24], этилового спирта [5, 10] и растительных масел [18]. В последние годы инициированы исследования по получению ЛК из различных агропромышленных, пищевых и бытовых отходов, таких как глицеринсодержащие отходы производства биодизельного топлива [15, 24], инулин [21], ксилроза [18] и др.

Целью настоящей работы явилось изучение биосинтеза ЛК из очищенной глюкозы и глюкозосодержащих гидролизатов древесины с помощью дрожжей *Y. lipolytica* в условиях периодического и непрерывного культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали специально селекционированный штамм дрожжей *Y. lipolytica* № 15 — продуцент ЛК из глюкозы [7]. Мутант был получен обработкой природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 ультрафиолетовым облучением и N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином. Мутант поддерживали на агаризованной среде Ридер с глюкозой при 4 °С.

Периодическое культивирование *Y. lipolytica* № 15 проводили в ферментере АНКУМ-2М (Россия) объемом 10 л (исходный объем среды 5,0 л). Автоматически поддерживали температуру (29 °С), концентрацию растворенного в среде кислорода (20–25% в период роста и 40–50% от насыщения в период кислотообразования), рН среды 4,5 подтитровкой 20%-ным раствором NaOH. Среда имела следующий состав (г/л): NH₄Cl — 3,0; MgSO₄·7H₂O — 1,0; K₂HPO₄ — 0,2; дрожжевой экстракт «Difco» — 1,0. Глюкозу исходно вносили 20 г/л и далее по 20 г/л в момент повышения ρO₂ на 5–10% в сравнении со стабильным уровнем насыщения кислорода; такое повышение ρO₂ указывало на полное потребление субстрата. Общая продолжительность культивирования — 192 ч.

Продолжительное культивирование в режиме отъемов-доливов осуществлялось в ферментере Biostat В Braun (Германия) («Sartorius», Germany) объемом 3 л (исходный объем среды 1,2 л). Отъемы-доливы осуществлялись следующим образом: по истечении определенного периода времени часть культуральной жидкости с клетками удаляли и добавляли в ферментер свежую питательную среду до первоначального объема 1,2 л. Были исследованы следующие варианты отъемов-доливов: 30 и 40 %.

Рост дрожжей контролировали по весу сухой биомассы.

Для определения содержания органических кислот применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Элюцию проводили при следующих условиях: скорость элюции 0,6 мл/мин; температура 35 °С, в качестве элюанта использовали серную кислоту 20 mM. В работе используют HPLC хроматограф фирмы Beckman Gold System, (США) и колонку Aminex HPLC87H для разделения ЛК и изолимонной кислот (ИЛК). Регистрацию кислот проводят при длине волны 210 нм. В исследовании органические кислоты (ЛК, ИЛК и др.) идентифицировали с соответствующими стандартами — реактивы фирмы «Реахим» (Россия) и «Sigma» (США). При культивировании в режиме отъемов-доливов анализ органических кислот проводили как описано ранее [23].

Для определения аминокислот в клетках дрожжей биомассу лиофилизировали. Затем к 20–30 мг сухой биомассы добавляли 2 мл 80%-ного подкисленного HCl этанола и выдерживали 24 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт центрифугировали, осадок удаляли, а супернатант использовали для исследования на анализаторе аминокислот по методу Спекмана.

Удельную скорость роста дрожжей (μ) за определенный промежуток времени рассчитывали по уравнению:

$$\mu = \frac{\ln(x_2 - x_1)}{t_2 - t_1},$$

где x_2 — концентрация биомассы в конечный момент времени, г/л; x_1 — концентрация биомассы в начальный момент времени, г/л; $(t_2 - t_1)$ — промежуток времени, в течение которого возросла биомасса, ч.

Выход продукта по субстрату (Y , %) был рассчитан по уравнению: $Y = \frac{P}{S} \cdot 100$,

удельная скорость синтеза ЛК (q_p , г/г биомассы в час) была рассчитана с использованием следующего уравнения: $q_p = \frac{P}{x \cdot t}$,

объемную продуктивность процесса биосинтеза ЛК (C_{LK} , г/л·ч) рассчитывали по уравнению:

$$C_{LK} = \frac{P}{V \cdot t},$$

где P — общее количество ЛК с учетом фактора разведения в конце культивирования, г; S — количество потребленного субстрата за время кислотообразования, г; x — общее содержание биомассы в конце культивирования, г; V — начальный объем среды (л); t — продолжительность культивирования, ч.

Результаты и обсуждение

Периодический способ получения ЛК

На рисунке 1а приведены кривые роста дрожжей *Y. lipolytica* № 15, потребления азота, накопления ЛК и побочного продукта ферментации — изолимонной кислоты (ИЛК). В течение первых 3 ч не наблюдалось явного роста. С 3 до 16 ч рост *Y. lipolytica* был линейный (экспоненциальная фаза), так как питательные вещества имелись в избытке, параметры культивирования были близки к идеальным, а ингибиторы роста клеток отсутствовали; значение максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}) в этот период составляло $0,205 \text{ ч}^{-1}$. С 16 ч культура переходила в фазу замедленного роста, вызванную истощением азота из среды, и удельная скорость роста постепенно снижалась до $0,016 \text{ ч}^{-1}$; на 44 ч рост культуры полностью прекращался. В экспоненциальной фазе выделения ЛК в среду не происходило; интенсивная экскреция ЛК отмечалась в фазе замедления роста и в стационарной фазе после прекращения роста культуры. В конце культивирования на 192 ч мутант *Y. lipolytica* № 15 синтезировал 100 г/л ЛК и 4 г/л ИЛК (3,8% от суммы кислот); соотношение ЛК:ИЛК составляло 23:1; продуктивность ферментера ($S_{\text{ЛК}}$) и выход продукта (Y) составляли $0,67 \text{ г/л} \cdot \text{ч}$ и 63%, соответственно.

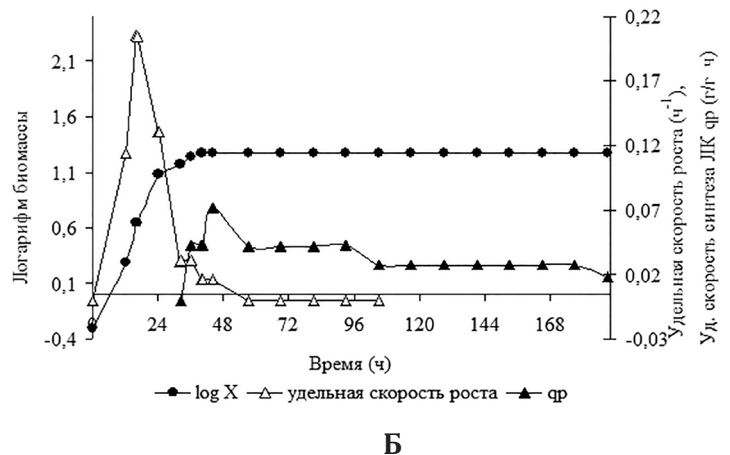
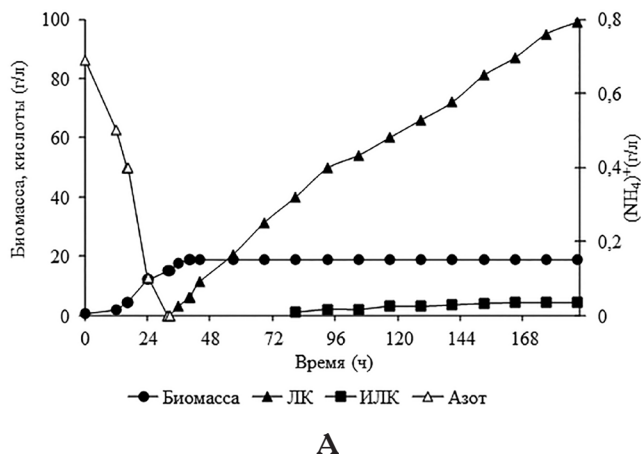


Рис. 1. Динамика роста, потребления азота и синтеза кислот в среде с глюкозой у *Y. lipolytica* № 15 (А) и рассчитанные параметры процесса (Б)

Ингибирование конечным продуктом

Исследование влияния торможения высокими концентрациями ЛК на кислотообразование проводили по следующей схеме: клетки, находящиеся в фазе активного кислотообразования (33 ч), отбирали из ферментера, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды промывали 0,9% NaCl и суспензировали

Как видно из данных, представленных на рисунке 1б, продуктивность культуры, максимальная в начале биосинтеза ЛК, постепенно снижалась при накоплении ЛК свыше 50–60 г/л, что делает нецелесообразным продолжение процесса дольше 4–5 суток. Снижение активности синтеза ЛК согласуется с морфологическими изменениями клеточной популяции *Y. lipolytica* № 15. В период наиболее активного биосинтеза ЛК, который происходил с 30 до 93 ч, культура была представлена округлыми, овальными и слегка удлинёнными клетками, клетками неправильной формы, количество мелких клеток составляло примерно 10% от общего количества клеток. В период интенсивного биосинтеза ЛК содержимое клеток — плотное, зернистое, в каждой клетке — 1–2 липидные гранулы, вакуоли хорошо развиты, особенно в клетках неправильной формы; содержание плазмоллизированных клеток составляло не более 5% от общего количества клеток. В период снижения кислотообразования (начиная с 93 ч культивирования) количество мелких клеток постепенно увеличивается и к концу культивирования достигает 50–60%, а количество мертвых плазмоллизированных клеток достигает 30–40% от общего количества клеток. Возможной причиной снижения кислотообразующей активности продуцента является ингибирующее действие высокой концентрации ЛК.

в 50 мМ фосфатном буфере ($\text{pH}=7,0$). Клеточную суспензию в конечной концентрации 3 г/л вносили в колбы объемом 750 мл с 50 мл среды Ридер, содержащей 10 г/л глюкозы и инкубировали на качалке при 29°C в течение 24 ч. ЛК (условно названную экзогенной ЛК) вносили в среду инкубации до засева клеток. Концентрацию экзогенной ЛК подбирали с учетом низкой плотности

клеток в колбах. Так, 80 г/л ЛК в ферментере при рабочей биомассе 20 г/л соответствуют 12 г/л ЛК в колбе при рабочей биомассе 3 г/л.

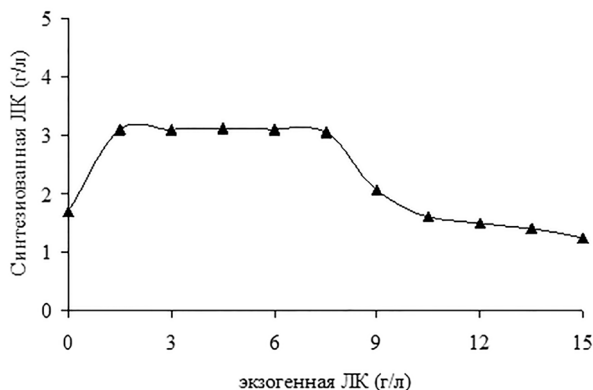


Рис. 2. Влияние ЛК в среде культивирования на кислотообразование у *Y. lipolytica*

Как видно из рисунка 2, биосинтез ЛК происходил активнее в присутствии экзогенно добавленной ЛК (1 г/л), чем без ЛК в среде. Концентрация ЛК в диапазоне 1 до 7,5 г/л в колбе не ингибирует дрожжи *Y. lipolytica* № 15. При дальнейшем увеличении концентрации ЛК с 7,5 до 15 г/л наблюдалось значительное снижение биосинтеза ЛК (в 2,48 раз). Микроскопирование клеток и анализ внеклеточного белка показали значительное разрушение клеток в вариантах опыта с экзогенной добавленной ЛК 7,5–15 г/л в колбе. Следует отметить, что в среде с глицерином концентрация ЛК не тормозила кислотообразующую активность дрожжей *Y. lipolytica* в более широком диапазоне (1–12 г/л), и лишь при концентрации экзогенной ЛК на уровне 30–40 г/л кислотообразование снижалось в 2 раза [15]. В литературе имеются сведения, что увеличение концентрации

цитрата по механизму отрицательной обратной связи ингибирует ключевой фермент гликолиза 6-фосфофруктокиназу у традиционных продуцентов ЛК — грибов *A. niger* и липидных дрожжей, у которых цитрат является предшественником в биосинтезе липидов и в целом снижает скорость трансформации глюкозы через гликолиз [8]. Имеется единственное сообщение об устойчивости дрожжей *Saccharomycopsis lipolytica* (син. *Yarrowia lipolytica*) к высоким концентрациям ЛК (235 г/л) при росте в среде с глюкозой [17].

Указанные недостатки периодического культивирования определяли необходимость поиска других способов культивирования, позволяющих продлить активный биосинтез ЛК.

Отъемно-доливной способ

Одним из перспективных способов увеличения продолжительности биосинтеза ЛК является культивирование с использованием режима отъемов-доливов [9, 10, 15, 23]. Отъемно-доливной способ культивирования представляет собой процесс, при котором производится отъем культуральной жидкости через определенные промежутки времени и в ферментер добавляется свежая питательная среда.

При проведении экспериментов варьировали количество доливаемой среды. Были исследованы следующие варианты проведения ферментации: 1) отъем-долив 40%, 5 циклов; 2) отъем-долив 30%, 5 циклов. Продолжительность цикла составляла 5–6 суток. Процесс культивирования продуцента *Y. lipolytica* в режиме отъемов-доливов продолжали в течение 1280 ч (53 суток). На рисунке 3 приведены несколько циклов для исследуемых режимов культивирования. Как видно из рисунка 3, даже в конце культивирования концентрация ЛК была высокой и составляла около 70 г/л.

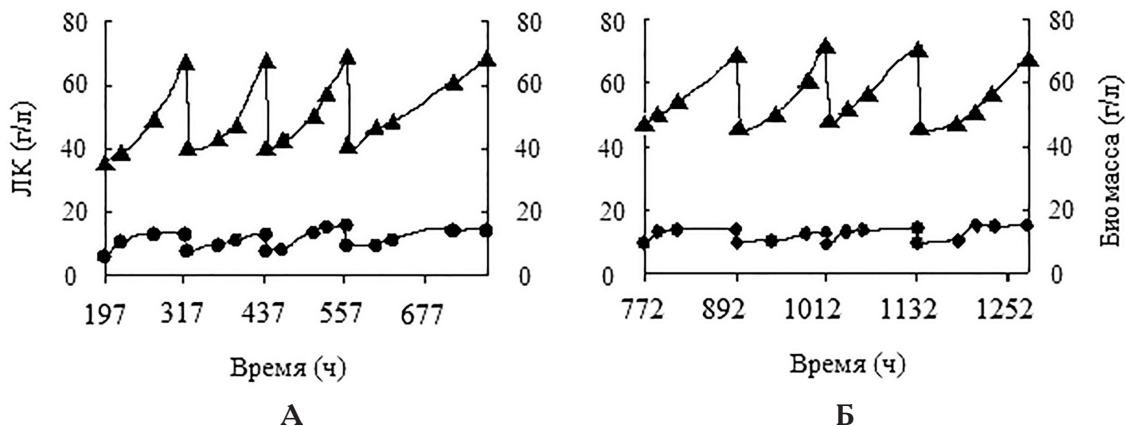


Рис. 3. Биосинтез ЛК дрожжами *Y. lipolytica* № 15 в режиме отъемов-доливов: отъем-долив 40% (А) и 30% (Б): • — биомасса, ▲ — ЛК

В таблице 1 представлены данные о содержании биомассы, ЛК, ИЛК, а также рассчитанные значения объемной продуктивности процесса ($C_{\text{ЛК}}$) и выход продукта ($Y_{\text{Л}}$). При всех изученных режимах в культуральной жидкости в момент отлива накапливалось 68,1–69,3

г/л ЛК, содержание ИЛК составляло 2,6–2,8% от суммы кислот. При использовании режима отъемов-доливов 40% каждые 5 суток наблюдается наиболее высокая продуктивность ферментера и выход ЛК, которые составляли 0,26 г/л·ч и 57%, соответственно.

Таблица 1

Биосинтез ЛК у дрожжей *Y. lipolytica* № 15 в режиме отъемов-доливов

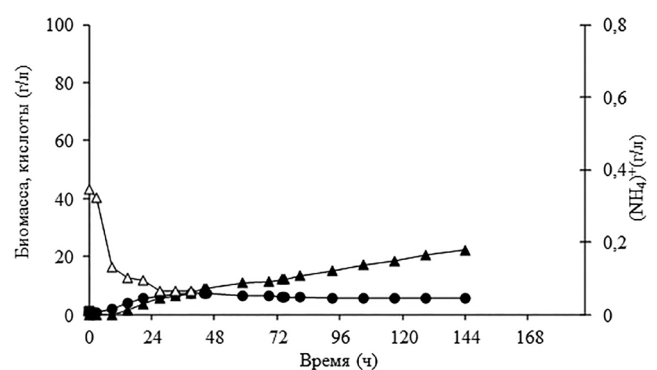
Отъем-долив	Биомасса (г/л)	ЛК (г/л)	ИЛК (% от суммы кислот)	СЛК (г/л·ч)	УЛК (%)
30%	13,7±1,3	69,4±2,2	2,8	0,23	47
40%	13,8±1,7	68,1±2,2	2,6	0,26	57

В литературе имеются сообщения о попытках осуществления продолжительного биосинтеза ЛК в режиме отъемов-доливов. Rane, Sims [22] для специально селекционированного штамма *S. lipolytica* Y-1095 в среде с глюкозой достигли стабильного биосинтеза ЛК в течение 500 ч с продуктивностью процесса ($C_{\text{ЛК}}$), равной 1,32 г/л·ч. Следует отметить, что высокая производительность ферментера достигалась за счет накопления биомассы продуцента на уровне 60 г/л; при этом выход продукта (Y) был снижен до 65% за счет затрат на поддержание высокой рабочей биомассы. Arzumov et al. [10] разработали отъемно-доливной способ, при котором активность культуры *Y. lipolytica* сохранялась в течение 700 ч в среде с этанолом. Anastassiadis & Rehm [9] представили данные о 20 последовательно проведенных отъемно-доливных циклах *S. oleophila* в среде с глюкозой. Авторы отмечают, что при проведении экспериментов не наблюдалось каких-либо технических проблем, а также проблем с удержанием культуры в физиологически активном состоянии. Rysińska, Rymowicz [25] проводили отъемно-доливное культивирование дрожжей *Y. lipolytica* в среде с глицеринсодержащими отходами (ГСО) производства биодизеля в течение 1350 и 1680 ч для штаммов *Y. lipolytica* Wratistavia 1.31 и Wratistavia AWG7, соответственно. При применении режима с доливом питательной среды 20% была достигнута высокая концентрация ЛК для обоих штаммов: 197 г/л — для *Y. lipolytica* Wratistavia AWG7 и 176 г/л — для *Y. lipolytica* Wratistavia 1.31. Мы показали, что отъемно-доливной метод культивирования является наиболее эффективным при биосинтезе ЛК из ГСО; режим отъемов-доливов обеспечивал накопление ЛК на уровне 124 г/л у мутантов *Y. lipolytica* A-101-1.22 в течение 47 суток и 145 г/л у *Y. lipolytica* № 15 в течение 36 суток [2, 4, 23]. При применении отъемно-доливного метода у природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 активный

биосинтез ЛК (79–82 г/л) из ГСО продолжался в течение 500 ч, в культуральной жидкости накапливались в основном двух- и трехзамещенные натриевые соли ЛК и ИЛК в соотношении 4,2:1 [15].

Биосинтез ЛК из глюкозосодержащих гидролизатов древесины

Глюкозосодержащий гидролизат был получен из измельченных опилок осины при проведении ферментации с использованием коммерческого ферментного препарата целлюлазы гриба *Trichoderma reesei* («Celluclast») с добавлением ферментного препарата целлобиазы 188 («Novozymes», Дания), которые катализируют расщепление плохо сбраживаемой целлюлозы до легко усвояемых углеводов — глюкозы, ксилозы и высших глюкозосодержащих полимеров. Содержание глюкозы в гидролизате составляло 15 г/л при общей сумме сахаров 35 г/л.

Рис. 4. Биосинтез ЛК у *Y. lipolytica* № 15 в среде с глюкозосодержащим гидролизатом осины

Процесс образования ЛК у мутанта № 15 из глюкозосодержащих отходов древесины представлен на рисунке 4. Процесс образования ЛК является трехфазным: в первой фазе происходит активный рост культуры и потребление азота из среды, в это время кислоты

практически не образуются. Интенсивный синтез кислот начинается после снижения содержания азота ниже порогового уровня (200 мг/л) и перехода культуры в фазу замедленного роста и далее — в стационарную фазу роста. Синтез кислот продолжается до тех пор, пока в среде присутствует источник углерода. На 144 ч роста при рабочей биомассе 6–7 г/л в среде культивирования накапливалось 22 г/л ЛК с выходом 50% от потребленной глюкозы. Аналогичные данные получены китайскими учеными со штаммом *Y. lipolytica* SWJ-1b, который синтезировал в среде с глюкозосодержащим гидролизатом соломы 26,7 г/л ЛК на 120 ч и 42,4 г/л на 240 ч [19].

В таблице 2 представлены данные об аминокислотном составе биомассы мутанта *Y. lipolytica* № 15, культивируемого в среде с глюкозосодержащим гидролизатом осины. В биомассе дрожжей обнаруживается 13 аминокислот, общий пул аминокислот составил 226,5 мг АК/10 г биомассы, то есть в биомассе

содержится 22,65% белка в условиях дефицита азота и сверхсинтеза ЛК (ненаправленный синтез белка). Согласно данным Ермаковой с соавт. [1], в условиях лимитирования роста клеток минеральными компонентами (N, P, S) содержание белка — 21%. Пул свободных аминокислот составил 5,4% от общей суммы, ГАМК — единственная аминокислота, не входящая в связанные белки. ГАМК имеет большой практический интерес, так как выполняет в организме функцию тормозного медиатора центральной нервной системы. Лиганды рецепторов ГАМК рассматриваются как потенциальные средства для лечения различных расстройств психики и центральной нервной системы, к которым относятся болезни Паркинсона и Альцгеймера, расстройства сна (бессонница, нарколепсия), эпилепсия. Под влиянием ГАМК активируются также энергетические процессы мозга, повышается дыхательная активность тканей, улучшается утилизация мозгом глюкозы, улучшается кровоснабжение.

Таблица 2

Аминокислотный состав биомассы *Y. lipolytica* № 15 по сравнению с «идеальным» белком

АК	Содержание АК (мг/10 г биомассы <i>Y. lipolytica</i> № 15)			Содержание АК (г/г 100 белка)	Идеальный белок по ФАО/ВОЗ
	Связанная форма	Свободная форма	Общее количество		
Аланин	13,42	1,65	15,07	5,1	—
Аргинин	следы	следы	следы	следы	—
Аспарагиновая к-та	26,17	0,32	26,48	10,1	—
Валин	18,43	1,27	19,69	7,5	5,0
Гистидин	5,84	0,23	5,96	2,3	—
Глутаминовая к-та	31,96	5,83	37,79	14,4	—
Глицин	15,91	0,32	16,23	6,2	—
Изолейцин	12,17	0,26	12,88	4,9	4,0
Лейцин	22,83	0,33	25,16	9,6	7,0
Лизин	18,67	0,58	19,25	7,3	5,5
Метионин	4,62	0	4,62	1,8	3,5
Пролин	следы	следы	следы	следы	—
Серин	13,83	0,34	14,16	5,4	—
Треонин	15,63	0,38	16,01	6,1	4,0
Триптофан	следы	следы	следы	следы	1,0
Фенилаланин+тирозин	12,77	следы	12,77	4,9	6,0
ГАМК	0	0,36	0,36	0,1	—

Как видно из таблицы 2, в аминокислотном составе белка в наибольшей концентрации присутствовали глутаминовая кислота (37,79 мг/10 г биомассы), аспарагиновая кислота (26,48 мг/10 г биомассы), лейцин (25,16 мг/10 г биомассы); содержание валина, глицина, изолейцина, лизина, серина, треонина, фенилаланина колебалось от 10 до 20 мг/10 г биомассы. Для оценки биологической ценности белка *Y. lipolytica* № 15 его аминокислотный состав (в г АК на 100 г белка) сравнивали с аминокислотным составом «идеального» белка (по шкале ФАО/ВОЗ). Сравнение белка *Y. lipolytica* № 15 с идеальным белком показало, что состав аминокислот и их количество примерно одинаковы.

Авторы выражают благодарность М. Ракиска (Вроцлавский университет экологии и биологических наук) за анализ лимонной и изолимонной кислот в эксперименте с отливами-доливами; В.Я. Лысанской (ИБФМ РАН) — за аминокислотный состав белка.

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

Литература

1. Ермакова И.Т., Ермоленко Е.А., Финогенова Т.В. Биосинтез α -кетокислот тиаминкислототрофными дрожжевыми организмами при использовании различных источников углерода // Прикл. биохим. микробиол. — 1986. — Т. 22. — № 3. — С. 341–347.
2. Камзолова С.В., Фатыхова А.Р., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты дрожжевыми организмами из глицерин-содержащих продуктов // Биотехнология. — 2008. — № 5. — С. 1–7.
3. Моргунов И.Г., Дедюхина Э.Г., Камзолова С.В., Чистякова Т.И., Лунина Ю.Н., Миронов А.А., Степанова Н.Н., Шемшурова О.Н., Вайнштейн М.Б. Микробиологическое получение препаратов органических кислот в качестве средств защиты растений // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 3. — С. 41–52.
4. Фатыхова А.Р., Камзолова С.В., Моргунов И.Г. Биосинтез лимонной кислоты дрожжами на среде с глицерином // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 5–13.
5. Финогенова Т.В., Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Чернявская О.Г. Перспективы производства органических кислот дрожжами *Yarrowia lipolytica* // Прикл. биохим. микробиол. — 2005. — Т. 41. — № 5. — С. 478–486.
6. Финогенова Т.В., Моргунов И.Г., Лауринвичюс К.С., Мельников В.А. Загрязнение полифосфатами как причина массового размножения цианобактерий в водоемах // Вода: химия и экология. — 2009. — № 3. — С. 30–35.
7. Финогенова Т.В., Пунтус И.Ф., Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Монастырская С.Е., Моргунов И.Г., Боронин А.М. Получение мутантных штаммов *Yarrowia lipolytica* — продуцентов лимонной кислоты из глюкозы // Прикл. биохим. микробиол. — 2008. — Т. 44. — № 2. — С. 197–202.
8. Anastassiadis S., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Finogenova T.V. Citric acid production patent review // Recent Pat. Biotechnol. — 2008. — Vol. 2. — No. 2. — P. 107–123.
9. Anastassiadis S., Rehm H.J. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation // E.J. Biotech. — 2006. — Vol. 9. — No. 1. — P. 26–39.
10. Arzumano T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeated-batch culture on ethanol // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — Vol. 53. — No. 5. — P. 525–529.
11. Ashkan T.N., Adeli M., Vossoughi M. Synthesis of gold nanoparticle necklaces using linear-dendritic copolymers // European Polymer Journal. — 2010. — Vol. 48. — No. 2. — P. 165–170.
12. Fu G.Y., Lu Y., Chi Z., Liu G.L., Zhao S.F., Jiang H., Chi Z.M. Cloning and characterization of a pyruvate carboxylase gene from *Penicillium rubens* and overexpression of the gene in the yeast *Yarrowia lipolytica* for enhanced citric acid production // Mar. Biotechnol. — 2016. — Vol. 18. — No. 1. — P. 1–14.
13. Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W., Wyss M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential // Crit. Rev. Microbiol. — 2014. — Vol. 40. — No. 3. — P. 187–206.
14. Kamzolova S.V., Lunina J.N., Morgunov I.G. Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast // JAOCS. — 2011. — Vol. 88. — No. 12. — P. 1965–1976.
15. Kamzolova S.V., Vinokurova N.G., Lunina J.N., Zelenkova N.F., Morgunov I.G. Production of technical-grade sodium citrate from glycerol-containing biodiesel waste by *Yarrowia lipolytica* // Bioresource Technol. — 2015. — Vol. 193. — P. 250–255.
16. Kang H.C., Park Y.H., Go S.J. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid // Microbiol. Res. — 2003. — Vol. 158. — No. 4. — P. 321–326.
17. Kim E.K., Roberts R.S. Rate equations for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by *Saccharomycopsis lipolytica* // Biotechnol. Bioeng. — 1991. — Vol. 37. — No. 10. — P. 985–988.

18. *Ledesma-Amaro R., Lazar Z., Rakicka M., Guo Z., Fouchard F., Coq A.C., Nicaud J.M.* Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose // *Metab. Eng.* – 2016. – Vol. 38. – P. 115–124.
19. *Liu X., Lv J., Zhang T., Deng Y.* Citric acid production from hydrolysate of pretreated straw cellulose by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using batch and fed-batch cultivation // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 45. – No. 8. – P. 825–835.
20. *Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N.* The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97. – No. 16. – P. 7387–7397.
21. *Rakicka M., Lazar Z., Rywinska A., Rymowicz W.* Efficient utilization of inulin and glycerol as fermentation substrates in erythritol and citric acid production using expressing inulinase // *Chemical Papers.* – 2016. – Vol. 70. – No. 11. – P. 1452–1459.
22. *Rane K.D., Sims K.* Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermenters // *Biotechnol. Bioeng.* – 1995. – Vol. 46. – No. 4. – P. 325–332.
23. *Rymowicz W., Fatykhova A.R., Kamzolova S.V., Rywińska A., Morgunov I.G.* Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 87. – No. 3. – P. 971–979.
24. *Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W.* Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications // *Biomass Bioenergy.* – 2013. – Vol. 48. – P. 148–166.
25. *Rywińska A., Rymowicz W.* High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 37. – No. 5. – P. 431–435.

BIOSYNTHESIS OF CITRIC ACID FROM GLUCOSE-CONTAINING WOOD HYDROLYSATES BY THE YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*

J.N. LUNINA¹, S.V. KAMZOLOVA¹, W. RYMOWICZ², A.V. AFONIN³, I.G. MORGUNOV¹

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

² Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland;

³ Joint Stock Company «The state scientific research institute of the biosynthesis of protein substances», Moscow, Russia

The process of the citric acid (CA) biosynthesis using the purified glucose and the glucose-containing wood hydrolysates by *Yarrowia lipolytica* yeast was studied. The specially selected mutant *Y. lipolytica* No. 15 produced 100 g/l of CA from the purified glucose with a product yield (Y_{CA}) equal to 63% at 192 h in the repeated batch mode. It was shown that in the batch mode the active acid production lasts 4–5 days only. The reason for reduction of the acid-producing activity of a producer is the inhibition of own synthesis by high concentration of CA accumulated into the medium. Using the repeated batch mode the active biosynthesis CA (68.1–69.3 g/l) continued for a long time (more than 1250 h). The possibility of CA production from glucose-containing wood hydrolysates was established with *Y. lipolytica* No. 15. The biomass of *Y. lipolytica* No. 15 was characterized by a high protein content (22,65% of absolute dry biomass) and essential amino acids: valine, leucine, lysine, methionine, etc. that indicates the high nutrition value of the protein.

Keywords: microbial synthesis, yeast *Yarrowia lipolytica*, citric acid, glucose, glucose-containing waste hydrolysates, aspen chips.

ОЧИСТКА ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

С.И. ЕВСЕГНЕЕВ, В.И. СУРОВЦЕВ, В.М. БОРЗЕНКОВ*, Ю.И. ХАТЮШИН, П.С. АКИМОВ

*ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск, Московская область*

Предложена методика очистки пероксидазы хрена для крупномасштабного получения фермента. Корневища измельчали и экстрагировали фермент водой, фильтровали и концентрировали на установке с польми волокнами. Сырую смесь белков очищали на колонках с ДЭАЭ- и КМ-целлюлозами методом адсорбционной хроматографии, ранее предложенным авторами. Этот метод позволяет упростить очистку по сравнению с традиционным методом ионообменной хроматографии, значительно снизить время на ее проведение и повысить выход очищенного фермента. В результате получен препарат пероксидазы, пригодный для приготовления иммуоферментных конъюгатов.

Ключевые слова: ДЭАЭ- и КМ-целлюлоза, ионообменник, буфер, пероксидаза хрена, адсорбционная и ионообменная хроматография.

Введение

Пероксидаза хрена (К.Ф. 1.11.1.7) — один из наиболее востребованных ферментов в биотехнологии. Хотя ее устойчивость по отношению к пероксиду водорода меньше, чем у необычно высокостабильной пероксидазы из листьев африканской пальмы [4], а также пероксидаз арахиса и сои [3]. Именно она используется для получения иммуоферментных конъюгатов, необходимых для массового обследования, вероятно, вследствие доступности исходного сырья. Для конъюгатов требуется пероксидаза высокой степени очистки, что достигается обычно ионообменной хроматографией с последующими стадиями на ДЭАЭ- и КМ-ионообменниках: ранее — на целлюлозных [2], а в настоящее время — на сефарозных. В выполненной авторами работе используются также ДЭАЭ- и КМ-целлюлоза как ионообменники для балластных белков и как целлюлозные адсорбенты для целевого белка [5]. Это позволяет упростить очистку, снизить время на ее проведение и повысить выход очищаемого фермента. Метод может быть использован не только для очистки пероксидазы, но и для других белков.

Цель настоящей работы — получение высокоочищенной пероксидазы из корневищ хрена с выходом не менее 60% активности в супернатанте методом адсорбционной хроматографии, пригодным для крупномасштабного использования.

Для метода ИФА нужно применять высокоочищенную пероксидазу с величиной RZ (показатель чистоты, отношение поглощения A_{403}/A_{275}) $> 3,0$ и активностью по субстрату АВТС > 1000 ед/мг. Сейчас в России не производится фермент такой чистоты в количествах, удовлетворяющих потребителей. В настоящей работе описывается опыт получения пероксидазы предложенным нами адсорбционным методом [5].

Материалы и методы

В работе использовали корневища хрена двухлетнего возраста сорта «Богомер». Они были выкопаны в период цветения (количество пероксидазы в этот период увеличивается в несколько раз). 200 кг корневищ тщательно отмывали проточной водой и измельчали на промышленной электромясорубке. Затем к измельченным корневищам добавляли воду (1,5 л воды на 1 кг корневищ) и экстрагировали фермент в реакторе с якорной мешалкой в течение 12 часов (100 об/мин). Первичную фильтрацию полученной суспензии корневищ проводили на пресс-фильтре через хлопчатобумажную ткань бельтинг «БФ». Далее фильтрацию и концентрирование в 50 раз проводили на установке с

© 2017 г. Евсегнеев С.И., Суровцев В.И., Борзенков В.М., Хатюшин Ю.И., Акимов П.С.

* Автор для переписки:

Борзенков Валерий Михайлович

к.б.н., ст. н. сотр. Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

E-mail: vmborzenkov@mail.ru

полыми волокнами AP-0,5-15 (НПО «Химволокно», г. Мытищи), отсекающими белки с молекулярной массой 15 кДа. 6 л жидкости, полученной после фильтрации и концентрирования, центрифугировали при 5000 g 20 мин. К супернатанту добавляли сухой гидрохлорид ТЭА до конечной концентрации 0,02 М и NaOH до pH 7,1. Супернатант пропускали через небольшую колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (4×7) со скоростью 400 мл/ч, уравновешенную 0,02 М ТЭА-HCl буфером, pH 7,1. Постепенно верх колонки становился темным, но осевшие частицы впоследствии легко удалялись 0,15 М NaOH. После выхода из колонки получали светло-желтый раствор с RZ 0,2.

350–400 мл раствора пероксидазы с RZ 0,2 в 0,02 М ТЭА-HCl буфере, pH 7,1 наносили на колонку (10×25) с ДЭАЭ-целлюлозой в Cl⁻-форме, уравновешенной тем же буфером. Осторожно добавляли раствор, пока он весь не впитается в сорбент (≈20 мин). По мере движения коричневого кольца фермента самотеком добавляли буфер, поддерживая уровень жидкости на вершине колонки неизменным. За прохождением фермента следили визуально. После выхода фермента (60–75 мин), не переводя в другой буфер, раствор наносили на колонку того же объема с КМ-целлюлозой в Na⁺-форме, уравновешенную 0,02 М MOPS-NaOH-буфером и вновь кольцо фермента медленно двигалось вниз. Все операции, кроме центрифугирования, проводили при комнатной температуре. Полученный раствор разделяли на порции по 300–400 мл и помещали в морозильное отделение холодильника при -18 °С. В таком виде фермент сохранялся без потери активности в течение 6 месяцев.

Концентрацию неочищенного фермента определяли методом Marion Bradford, а очищенного — по поглощению при 403 нм. Концентрация 1 мг фермента в 1 мл соответствует оптической плотности, равной 0,44 [5]. Активность пероксидазы определяли, используя в качестве субстрата АВТС. Реакционная смесь содержала 0,36 М АВТС, 5 мМ Н₂О₂ в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0. Коэффициент экстинкции продукта окисления АВТС при 405 нм был принят равным 36800 М⁻¹см⁻¹ [1, 6].

Результаты и обсуждение

Ранее пероксидаза хрена была получена из лиофилизованного порошка фермента с RZ ≈ 0,2 предложенным нами методом адсорбционной хроматографии [5]. Растворенный в соответствующем буфере препарат, использованный в качестве модельного белка, наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. В настоящей работе

исходным сырьем были корневища хрена, поэтому для того чтобы получить раствор с RZ 0,2, необходимо было проделать ряд дополнительных операций, требуемых для крупномасштабного получения пероксидазы. Поскольку метод применяется редко, целесообразно дать его краткое описание.

Очистка возможна, если целевой белок движется вниз по колонке с адсорбентом благодаря сорбции-десорбции, а балластные белки либо остаются на старте, либо двигаются вниз с большей скоростью, чем целевой белок. Это может быть в случае, если адсорбент-ионообменник уравновешивается буфером с pH, соответствующим pI нужного белка. В зависимости от заряда часть балластных белков останется в верхней части колонки, часть будет быстро двигаться вниз, отталкиваясь от частиц одноименно заряженного ионообменника, а целевой белок будет адсорбироваться на каждой частице носителя за счет слабых сил Лондона–Ван-дер-Ваальса и десорбироваться, если компоненты буфера будут конкурировать с ним за адсорбент.

Адсорбент-ионообменник должен быть устойчивым химически (в него необходимо вводить ионогенные группы), гидрофильным, не давать ситового эффекта, обладать большой сорбционной емкостью. По этим причинам в качестве адсорбентов-ионообменников использовали ДЭАЭ- и КМ-целлюлозы. Адсорбция-десорбция целевого белка идет на целлюлозе, а ионогенные группы требуются для связывания и элюции балластных белков.

Элюирующий буфер должен обеспечить десорбцию адсорбируемого белка, а также движение части балластных белков (остальные удерживаются вследствие ионного обмена), причем скорость движения целевого белка вниз по колонке должна быть меньше скорости балластных белков, движущихся под действием сил ионного взаимодействия. Такие условия, как установлено нами экспериментально [5], выполняются при использовании буфера, кислая часть которого состоит либо из одноосновной алифатической или сульфоновой кислот (RCOOH, RSO₃H), либо заряжена по типу R₃NH⁺. Радикалы обеспечивают конкуренцию с адсорбированным белком и его десорбцию, а ионы буфера на поверхности макромолекулы связывают контрионы (Cl⁻ или Na⁺), обеспечивая ионный обмен балластных белков. Буфер должен иметь небольшую концентрацию (0,02–0,03 М), так как при увеличении ее конкуренция с группами адсорбированного белка возрастает настолько, что белок быстро движется и смешивается с балластными белками. Буфер должен обеспечивать устойчивое значение pH и, следовательно, иметь pKa,

близкое к pI адсорбируемого белка. По этим причинам для очистки пероксидазы хрена на КМ-целлюлозе — фермента с pI 7,1 (вернее, нескольких изоферментов с близкими значениями pI) был использован буфер на основе 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновой кислоты с pKa 7,2.

Обычно, для очистки пероксидазы используют ионообменный метод на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозах. Однако, как правило, это не приводит к желаемой степени очистки и приходится вводить дополнитель-

ные стадии (например, гель-фильтрацию) [2]. Выход очищенного фермента составляет $\approx 5-10\%$. Весь цикл очистки проходит за 4–6 недель. При использовании адсорбционного метода цикл составляет 5–6 дней и другие стадии не нужны. Дополнительным преимуществом этого метода очистки является отсутствие необходимости приборов для снятия фермента с колонок — движущееся коричневое кольцо пероксидазы отмечается визуально. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Очистка пероксидазы адсорбционной хроматографией

Стадия очистки	Объем, мл	Общая активность $\times 10^6$, ед	Количество белка, г	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Исходный препарат	350	0,98	6,24	157	100
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	510	0,69	0,81	851	70
Хроматография на КМ-целлюлозе	815	0,63	0,61	1032	64

Заключение

В результате очистки был получен препарат пероксидазы с RZ 3,15 и удельной активностью по АВТС 1030 ед/мг, пригодный для использования в иммуноферментном анализе, поскольку фирмы (например, Sigma-Aldrich, США) предлагают для этих целей фермент с $RZ \approx 3,0$ и активностью по АВТС ≈ 1000 ед/мг.

Литература

1. Александрова Е.Ю., Орлова М.А., Нейман П.Л. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям // Вестн. Моск. ун-та, сер. 2, химия. — 2006. — Т. 47. — № 5. — С. 350–352.
2. Березин И.В., Угарова Н.Н., Кершенгольц Б.М., Бровко Л.Ю. Влияние простетической группы пероксидазы из хрена на стабильность фермента // Биохимия. — 1975. — Т. 40. — № 2. — С. 297–301.
3. Орлова М.А., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Газарян И.Г. Влияние ионов кальция и магния на радиационную инактивацию пероксидаз растений // Изв. РАН, сер. хим. — 1998. — № 3. — С. 522–526.

4. Орлова М.А. Радиоэнзимология — метод исследования свойств и структуры ферментов. — М.: «Изд-во МГУ», 2002. — 285 с.
5. Суrowцев В.И., Борзенков В.М., Детушев К.В. Адсорбционная хроматография белков // Биохимия. — 2009. — Т. 74. — С. 201–204.
6. Childs R.E., Bardsley W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen // Biochem. J. — 1975. — Vol. 145. — P. 93–103.

Список сокращений:

RZ — отношение оптической плотности раствора пероксидазы (концентрация фермента должна быть 0,1–0,15 мг/мл) при A_{403}/A_{275} — 3,03–3,09; МОРS — 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота; АВТС — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); ДЭАЭ-целлюлоза — диэтиламиноэтилцеллюлоза; КМ-целлюлоза — карбоксиметилцеллюлоза; ТЭА — триэтанолламин.

PURIFICATION OF HORSERADISH PEROXIDASE WITH ADSORPTION CHROMATOGRAPHY

S.I. EVSEGNEEV, V.I. SUROVTSEV, V.M. BORZENKOV, Y.I. KHATYUCHIN, P.S. AKIMOV

The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk,

A method of purification of horseradish peroxidase has been developed for the large scale production. Rhizomes of horseradish crushed and extracted with water, filtered, and concentrated by hollow fiber installation. The crude mixture of proteins was purified on columns with DEAE – and CM-celluloses by adsorption chromatography. This method allowed purification of enzyme to be made more easily compared with method of ion exchange chromatography significantly to reduce the time carrying out it and to increase the yield of the purified enzyme. Thus, the enzyme has been obtained by the method suitable for the preparation of immunoenzyme conjugates.

Keywords: DEAE and CM-cellulose, ion exchanger, buffer, peroxidase, adsorption and ion exchange chromatography..

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕОБРАЗОВАННОГО СОЛНЕЧНОГО СВЕТА НА ДОИМПЛАНТАЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ МЫШИ *IN VITRO*

А.С. ЧЕРНОВ^{1*}, Д.А. РЕШЕТНИКОВ⁴, А.А. МАНОХИН³, С.В. ГУДКОВ², Р.Н. ХРАМОВ⁵

¹ФГБУ «НИЦ Курчатовский институт»,

²ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН», Москва;

³ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН»,

⁴Пушкинский государственный естественно-научный институт,

⁵ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пушкино

В статье представлены результаты исследования воздействия искусственного солнечного света, преобразованного экраном (ПСС), содержащим слой фотолуминофора оксисульфида иттрия, активированного европием, на развитие ранних эмбрионов мыши в условиях культивирования *in vitro*. Облучение эмбрионов ПСС с дополнительной красной компонентой ($\lambda_{\text{max}} = 626$ нм) приводило к увеличению числа нормальных бластоцист и снижению в них числа мертвых и апоптотических клеток по сравнению с контролем. Методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол — р-йодофенол — пероксидаза хрена» было установлено, что под действием ПСС в культуральной среде более чем в 7 раз увеличивается концентрация перекиси водорода.

Ключевые слова: бластоцисты, преобразованный солнечный свет, фотостимуляция раннего развития, перекись водорода.

Введение

Переход от доимплантационного развития к постимплантационному в раннем эмбриогенезе млекопитающих является крайне важным моментом, связанным с выходом бластоцисты из оболочки оплодотворения и ее имплантацией. Известно, что число выходов бластоцист из оболочки оплодотворения в условиях *in vitro* значительно ниже, чем в условиях *in vivo* [4], что, в первую очередь, обусловлено негативным воздействием света (видимого и лабораторного освещения) [12, 17, 20, 23, 27]. Облучение одноклеточных зигот хомяков видимым светом инициирует увеличение ДНК-повреждений [16, 26, 29,], у хомяков и кроликов уменьшается число эмбрионов, развившихся до стадии морулы и бластоцисты [17, 23]. Длительное облучение эмбрионов кролика видимым светом приводит к морфологическим изменениям ядра, увеличению плотности цитоплазмы и значительной дегенерации blastomeres [12]. Наибольшее повреждающее

действие видимый свет оказывает в синей части спектра, в диапазоне 445–500 нм, активизируя синтез белков теплового шока и появление большого количества апоптотических клеток в эмбрионах на стадии бластоцисты [29]. Однако есть работы, свидетельствующие и о положительном воздействии видимого света в красной области (620–750 нм) на развитие клеток и состояние организма в целом [9, 28]. Установлено положительное воздействие света красного и инфракрасного диапазонов на созревание лимфоцитов [24], рост фибробластов [11] и кератиноцитов [10], а также развитие мезенхимальных стволовых клеток [28]. Кроме того, красный свет способен стимулировать развитие ранних эмбрионов хомяков [29] и зигот мышей в условиях культивирования *in vitro* [5, 7].

Но несмотря на большое количество экспериментальных работ, до сих пор нет полного понимания механизма биологического действия красного света на живые системы разного уровня организации. Есть сведения, что дыхательные цепи как эукариотических, так и прокариотических клеток обладают светочувствительностью [1, 25]. Облучение светом красного диапазона увеличивает синтез АТФ в изолированных митохондриях печени крысы [18]. Свет с длиной волны 633 нм повышает мембранный потенциал митохондрий и протонный градиент, вызывает изменения в оптических свойствах митохондрий, увеличивает скорость

© 2017 г. Чернов А.С., Решетников Д.А., Манохин А.А., Гудков С.В., Храмов Р.Н.

* Автор для переписки:

Чернов Александр Сергеевич

к.б.н., ведущий инженер

НИЦ Курчатовский институт

E-mail: alexandrchernov1984@gmail.com;

обмена АДФ/АТФ, повышает продукцию активных форм кислорода (АФК), а также инициирует работу внутриклеточных сигнальных каскадов, ответственных за клеточную пролиферацию и цитопротекцию [13, 14, 19].

Таким образом, свет красного диапазона является перспективным инструментом нормализации процессов развития ранних эмбрионов млекопитающих в условиях *in vitro*. Основной проблемой при реализации данного подхода является отсутствие четких представлений о механизмах воздействия света на половые клетки и эмбрионы млекопитающих. Целью настоящей работы было исследование воздействия искусственного солнечного света с дополнительной люминесцентной красной компонентой на доимплантационное развитие и морфофункциональное состояние эмбрионов мыши в условиях культивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование биологического воздействия света проводили на двухклеточных эмбрионах, полученных от самок мышей стока Kv:SHK. На второй день беременности мышей забивали цервикальной дислокацией и эмбрионы вымывали из яйцеводов. Для манипуляций с

эмбрионами использовали среду M2 (Sigma). Культивирование эмбрионов проводили в CO₂-инкубаторе в среде M16 (Sigma) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Перед облучением каждую группу зигот помещали в индивидуальную лунку четырехлуночной планшета, содержащую среду M2. Облучение эмбрионов преобразованным солнечным светом проводили однократно в течение 15 минут при дозе облучения: для СС-УФ – 19,2 Дж/см², для ПСС – 20 Дж/см² с дополнительной энергией оранжево-красной компоненты 0,8 Дж/см² [7]. Эмбрионы контрольной группы не подвергались облучению.

Состояние развивающихся эмбрионов определяли в течение четырех суток (96 часов) до достижения контрольными эмбрионами стадии бластоцисты. Состояние эмбрионов на стадии бластоцисты оценивали морфологически (по форме, размерам и расположению клеток трофобласта и внутренней клеточной массы (ВКМ)) (рис. 1). Определяли число эмбрионов, сформировавших бластоцисту, количество бластоцист с нарушением морфологии и количество погибших эмбрионов. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Origin Pro. Статистическую обработку результатов проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни.

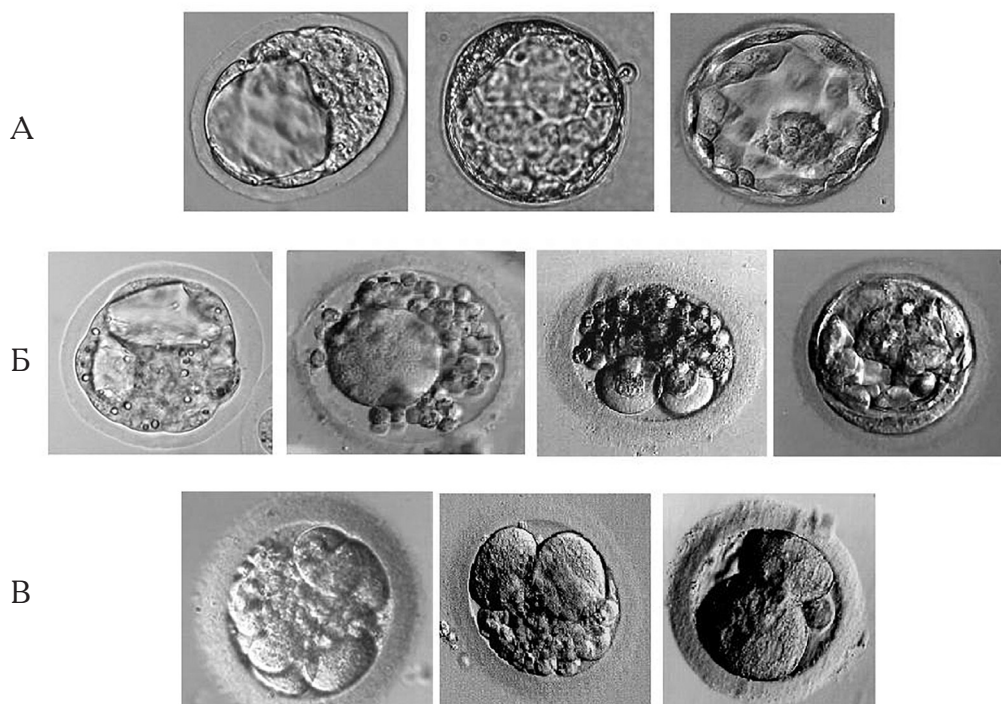


Рис. 1. Морфологическая оценка эмбрионов мыши на последнем этапе культивирования. А – нормальные бластоцисты (средняя, выклеывающаяся, поздняя). Б – аномальные бластоцисты (двойная область закладки бластоцелля, нарушение компактизации и кавитации, деградация клеток ВКМ). В – погибшие в процессе культивирования (дефрагментация бластомеров, остановка развития)

В качестве источника света использовали лабораторную осветительную систему ЛОС-1 (СКБ БП, СССР) с ксеноновой лампой XBO-150 W/4 (OSRAM, Германия) мощностью 150 Вт, свет от которой проходит через специально приготовленный светопреобразующий экран. Экран представляет собой квадратную пластину размером 5×5 см² и толщиной 1 мм из поликарбонатного пластика, содержащего УФ-адсорбер, поглощающий ультрафиолетовый свет. С одной стороны на экран нанесен слой силиконового полимера с люминофором оксисульфидом иттрия, активированным европием ($Y_{1,9}Eu_{0,1}O_2S$), с поверхностной плотностью 20 мг/см², спектр возбуждения которого

находится в УФ-диапазоне 200–370 нм, с основным эмиссионным излучением в области оранжево-красного диапазона с максимумом люминесценции в 626 нм. Облучение через экран со стороны нанесенного слоя фотолюминофора создает поток модельного солнечного излучения, содержащего дополнительную люминесцентную компоненту (ПСС), в то время как облучение через перевернутый экран, расположенный люминофорным слоем после поликарбонатной пластины, позволяет создать для сравнения контрольный (без УФ и люминесцентной компоненты) поток света (СС-УФ), идентичный ПСС в видимом и инфракрасном диапазонах (рис. 2).

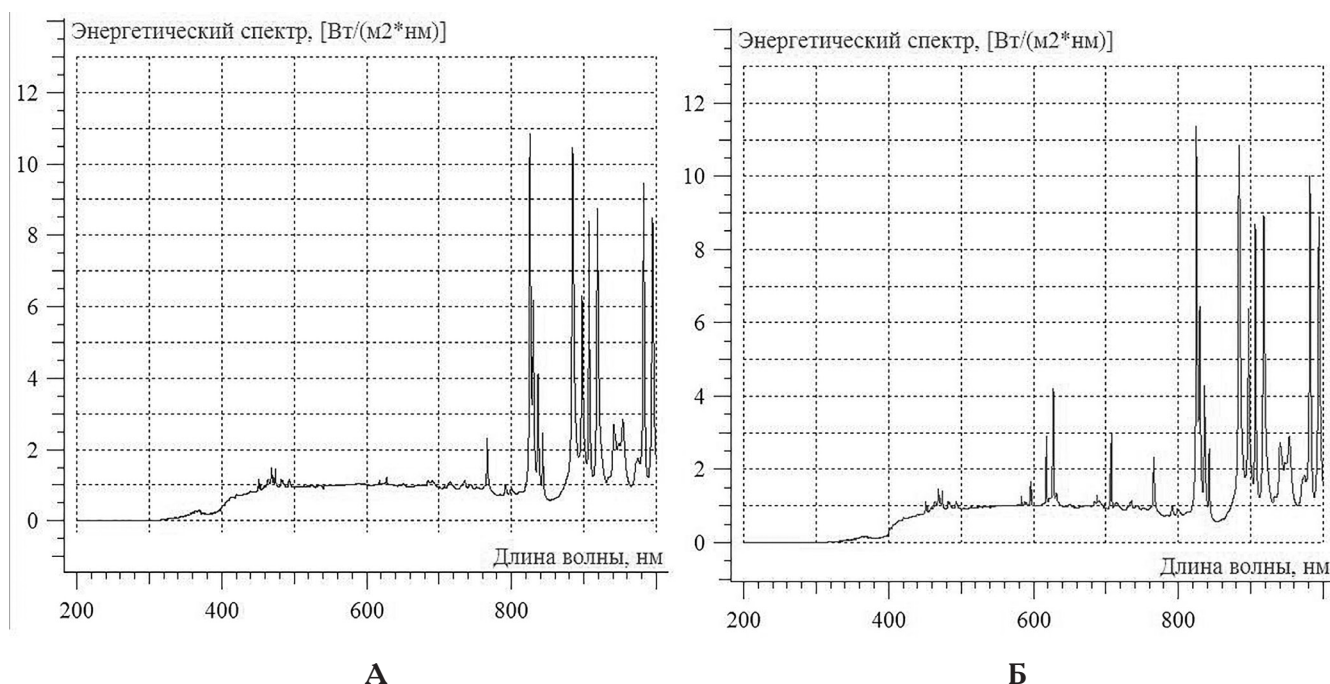


Рис. 2. Энергетический спектр светового потока от осветителя ЛОС-1, прошедшего через люминесцентный экран с люминофором $Y_{1,9}Eu_{0,1}O_2S$ в концентрации 20 мг/см²: А — без люминесценции (СС-УФ), Б — с люминесценцией (ПСС), $\lambda_{\max} = 626$ нм

Для снятия спектральных характеристик света в диапазоне от 200 до 1000 нм использовался компьютеризированный комплекс спектральной аппаратуры на базе монохроматора МДР-41 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия). Калибровку спектров по измерениям энергетической освещенности в условиях эксперимента проводили с помощью пиранометра СМР-3 (Kipp & Zonen, Нидерланды), с постоянной спектральной чувствительностью в диапазоне от 310 до 2800 нм.

Образование H_2O_2 в культуральной среде под влиянием ПСС измеряли высокочувствительным методом усиленной хемилюминесценции в системе «люминол — р-йодфенол — пероксидаза хрена» [8]. Интенсивность хемилюминесценции измеряли с помощью жидкостного

сцинтилляционного счетчика Бета-1 («Медаппаратура», Украина). Калибровку измерений проводили с помощью известной концентрации H_2O_2 .

Анализ морфо-функционального состояния сформировавшихся бластоцист проводили методом флуоресцентного окрашивания красителями YO-PRO-1 и пропидия йодида PI. За накопление YO-PRO-1 внутри цитоплазмы отвечают ионные каналы P2RX7, активация которых происходит при запуске апоптоза. PI не имеет интегрированных в мембрану специфических переносчиков и может проникать в цитоплазму и ядро только через поврежденные, фрагментированные мембраны на финальных стадиях апоптоза или при некрозе. Красители добавляли в среду с эмбрионами в концен-

трации 5 мг/мл. После инкубации в течение 45 минут в CO₂-инкубаторе осуществляли микрофотосъемку клеток с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, Zeiss.

Результаты и обсуждение

Как было сказано ранее, свет видимого диапазона в зависимости от длины волны может оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на жизнеспособность ранних эмбрионов. Например, свет красного диапазона способен оказывать положительное воздействие на жизнеспособность ооцитов мышей [5, 7] и рост ранних эмбрионов хомяков [17]. Поскольку при работе с эмбрионами в условиях *in vitro* они подвергаются воздействию всего диапазона видимого, УФ- и ИК-диапазонов спектра, нами было проведено исследование по воздействию света от ксеноновой лампы (спектр которой достаточно приближен к спектру солнечного света), а также преобразованного солнечного света с дополнительной красной компонентой (ПСС) без УФ-компонент и света без дополнительной красной и УФ-компонент (СС-УФ) на развитие двухклеточных эмбрионов мыши в условиях культивирования *in vitro*.

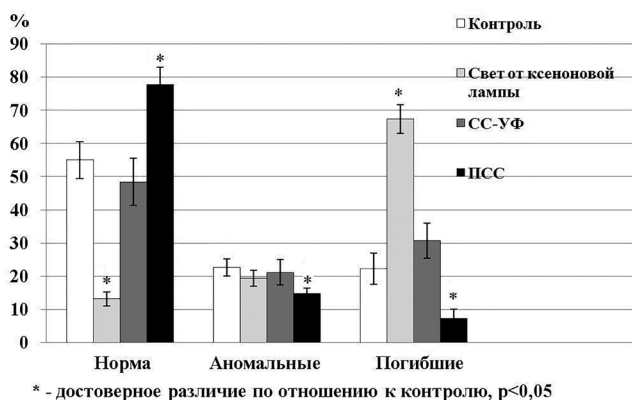


Рис. 3. Формирование нормальных и аномальных бластоцист при культивировании двухклеточных эмбрионов *in vitro*, облученных светом от ксеноновой лампы, СС-УФ и ПСС (по морфологической оценке согласно рис. 1). СС-УФ — преобразованный свет без люминесценции, ПСС — преобразованный свет с дополнительной люминесцентной компонентой

На рисунке 3 видно, что в отсутствие облучения (контроль) до стадии бластоцисты доходит 55% эмбрионов. Количество аномально развитых бластоцист и погибших эмбрионов составляет 22,7 и 22,3%, соответственно. При облучении эмбрионов светом от ксеноновой

лампы без использования светопреобразующих экранов до стадии бластоцисты развилось лишь 13,2%, что было достоверно ниже значений, полученных в контрольной группе (55%). Количество аномально развитых бластоцист составило 19,4%. Остальные эмбрионы погибли в ходе культивирования (67,4%).

Облучение двухклеточных эмбрионов мышей ПСС в течение 15 минут оказывает достоверное, по сравнению с контролем, положительное действие на процесс формирования нормальных бластоцист (77,8%), снижает количество аномально развитых бластоцист (14,8%) и погибших эмбрионов (7,4%). При этом, как было установлено, дополнительная люминесцентная компонента при 15-минутной экспозиции составляет всего 0,8 Дж/см² (около 4% от светового потока в диапазоне 400–800 нм).

Действительно ли увеличение дозы облучения в видимой области всего на 4% оказывает такое значительное влияние на увеличение числа нормально сформированных бластоцист или этот эффект обусловлен способностью экрана отсекал вредное УФ-излучение ксеноновой лампы? Чтобы ответить на этот вопрос, было проведено исследование влияния света, прошедшего через экран, но без люминесцентной компоненты (свет без УФ, СС-УФ), на развитие двухклеточных эмбрионов. Облучение эмбрионов СС-УФ приводило к формированию 48,4% нормальных бластоцист, что было на уровне контрольной группы (55%), но достоверно ниже, чем в группе ПСС (77,8%). Кроме того, количество погибших эмбрионов составило 30,7%, что в 4 раза выше значений для группы ПСС (7,4%).

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что вне зависимости от стадии развития эмбрионов (зигота, двухклеточная) преобразованный солнечный свет при дозе облучения 20 Дж/см² в течение 15 мин способен стимулировать процесс развития, которое проявляется в ускоренном формировании бластоцист с увеличением количества бластоцист, вышедших из блестящей оболочки и способных продолжить последующее постимплантационное развитие. При этом показано, что данная стимуляция происходит благодаря дополнительной люминесцентной красной компоненте с максимумом излучения 626 нм, а не в результате фильтрации УФ-компоненты в исходном излучении.

Бластоциста является конечной стадией доимплантационного развития, после которой начинается процесс имплантации зародыша в стенку эндометрия. Бластоциста состоит из двух клеточных популяций: трофобласта, который участвует в имплантации, и эмбриобласта,

дающего начало собственно телу плода, а также мезодермальным и энтодермальным структурам внезародышевых органов. Известно, что при внешне нормальной морфологии бластоцист иногда возникают нарушения при их последующей имплантации и постимплантационном развитии, что обусловлено нарушениями целостности клеток эмбриобласта и трофобласта [15]. В связи с этим

нами был осуществлен анализ морфо-функционального состояния клеток в сформировавшихся бластоцистах контрольной группы и групп после облучения ПСС и СС-УФ. Окрашивание бластоцист контрольной и опытных групп проводилось с помощью флуоресцентного красителя Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes) (рис. 4).

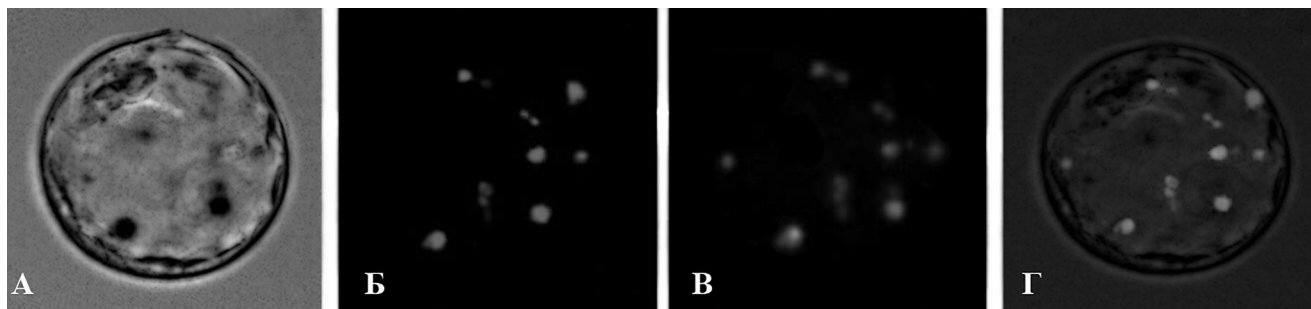


Рис. 4. Морфо-функциональное состояние клеток в сформировавшихся бластоцистах: А — поздняя бластоциста, фазовый контраст, Б — окрашенные мертвые клетки красителем PI (клетки окрашены в красный цвет), В — окрашенные апоптотические клетки красителем YO-PRO-1 (клетки окрашены в зеленый цвет), Г — совмещенные изображения А, Б и В (клетки имеют разнообразное окрашивание)

Анализ данных флуоресцентного окрашивания клеток показал, что в бластоцистах контрольной группы (63) и в группе СС-УФ (57) наблюдали большее количество мертвых клеток по сравнению с группой ПСС (27). Аналогичная ситуация наблюдалась и с апоптотическими клетками: так, в контроле и в группе СС-УФ их было 19 и 21, соответственно, в то время как в группе ПСС было всего 7 (табл. 1).

Таблица 1

Оценка функционального состояния клеток бластоцист после 96 часов культивирования двухклеточных эмбрионов *in vitro*

Объект	Контроль (интактные), шт	СС-УФ, шт	ПСС, шт
Мертвые клетки	63	57	27*
Апоптотические клетки	19	21	7*
Всего исследовано бластоцист, шт	30	31	31

Примечание: * — достоверное различие по отношению к контролю, $p < 0,05$

Из полученных данных видно, что эмбрионы, подвергшиеся воздействию ПСС, при морфологической норме развития бластоцист сохраняют функциональную целостность клеток эмбриобласта и трофобласта по сравнению с контролем. Эмбрионы, облученные светом без дополнительной люминесцентной компоненты

(СС-УФ), не отличались от контрольной группы, демонстрируя сходные морфо-функциональные характеристики клеток. Таким образом, использование преобразованного света при культивировании ранних эмбрионов в условиях *in vitro* положительно влияет на процесс формирования бластоцист и обеспечивает высокое качество их клеток.

Как известно, феномен фотобиомодуляции затрагивает разнообразные биологические процессы, включая клеточную пролиферацию, синтез ростовых факторов, увеличение клеточной подвижности, восстановительные процессы и многие другие [16, 22, 30]. Механизмы стимулирующего воздействия красного света в настоящее время еще недостаточно изучены, однако продемонстрированы увеличение скорости обмена АДФ/АТФ, повышение продукции АФК, инициация работы внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирующих клеточную пролиферацию и цитопротекцию. Под действием видимого света и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода (477, 577, 630, 760, 919, 1063, 1264 нм) происходит образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов. Эти активные формы кислорода образуются при воздействии как солнечного, так и искусственных источников света, в том числе источников низкоинтенсивных лазерных излучений [3]. Известно, что низкие концентрации H_2O_2 внутри клетки выполняют сигнальную функцию, играют важную роль в регуляции сигнальных ферментов, в клеточной пролиферации, дифференцировке, миграции

и апоптозе [6]. Показано, что механизмы защитных эффектов репарации ДНК в лейкоцитах периферической крови мышей связаны с индукцией адаптивного ответа наномолярными концентрациями перекиси водорода, индуцируемые оранжево-красным светом [2].

В связи с этим нами было проведено исследование по определению концентрации H_2O_2 в культуральной среде после ее 15-минутного облучения ПСС. В качестве контрольного раствора для определения значений перекиси водорода под действием ПСС использовали бидистиллированную воду. Результаты представлены на рисунке 5.

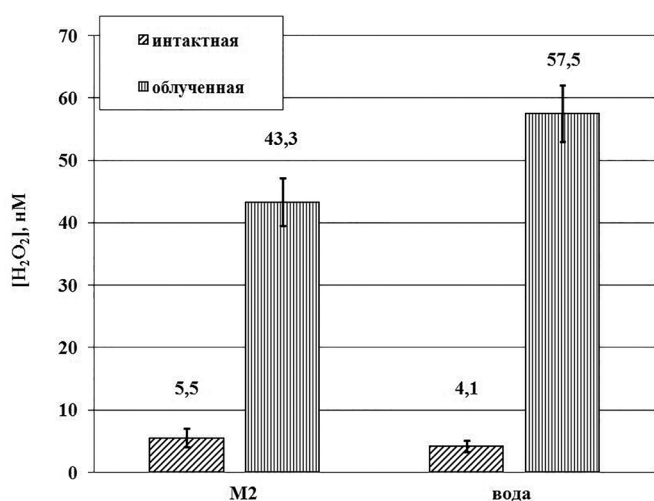


Рис. 5. Образование перекиси водорода в культуральной среде М2 и в воде после их облучения преобразованным солнечным светом в течение 15 минут

Как видно из гистограммы (рис. 5), при облучении ПСС в течение 15 минут и в воде, и в культуральной среде наблюдали существенное увеличение концентрации перекиси водорода по сравнению с исходными значениями необлученных растворов. В бидистиллированной воде концентрация перекиси водорода после облучения увеличилась с 4,1 до 57,5 нМ, а в культуральной среде М2 — с 5,5 до 43,3 нМ. Известно, что малые количества H_2O_2 не только не вызывают заметных повреждений клетки, но и оказывают митогенный эффект. Так, например, добавление H_2O_2 к смешанной культуре лимфоцитов приводит к значительному росту маркера пролиферативной активности клеток [21]. Из полученных нами результатов можно предположить, что перекись водорода, образующаяся в среде под действием ПСС, играет роль вторичного посредника в метаболизме ранних эмбрионов мыши и активизирует работу внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирующих клеточную пролиферацию и цитопротекцию.

Заключение

В настоящей работе было проведено исследование воздействия преобразованного красного света с дополнительной люминесцентной компонентой на рост и развитие двухклеточных эмбрионов мыши. Обнаружено, что облучение эмбрионов преобразованным солнечным светом в дозе 20 Дж/см^2 в течение 15 минут приводит к увеличению числа нормально сформированных бластоцист, а также уменьшает количество аномальных и погибших эмбрионов по сравнению с интактным контролем. При этом оптимальная величина дополнительной люминесцентной красной компоненты составляет $0,8 \text{ Дж/см}^2$, что очень близко к величине оптимальной дозы облучения гелий-неонового лазера для стимуляции пролиферации клеток фибробластов *in vitro*. Анализ морфо-функционального состояния клеток, сформировавшихся в процессе культивирования бластоцист, показал, что после облучения ПСС происходит снижение числа мертвых и апоптотических клеток в опытной группе. Возможно, данный эффект может быть обусловлен воздействием на эмбрионы наномолярных концентраций H_2O_2 , образующихся в среде после облучения преобразованным светом с дополнительной красной компонентой, выступающей в роли вторичного мессенджера, способного запускать ряд внутриклеточных процессов в эмбрионе. В результате оказывается значительное влияние на процессы деления-дробления, протекающие в раннем эмбрионе и при последующем развитии, обеспечивается нормальное развитие зародыша.

Литература

1. Векшин Н.А. Светозависимое фосфорилирование в митохондриях // Мол. биол. — 1991. — Т. 4. — С. 54–59.
2. Гапеев А.Б., Юршенас Д.А., Манохин А.А., Храмов Р.Н. Защита ДНК лейкоцитов крови от повреждающего действия ультрафиолетового излучения при использовании стратегии «Полезное солнце» // Биофизика, 2017. (в печати).
3. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А., Иванов В.Е., Черников А.В., Манохин А.А., Асташев М.Е., Ягужинский Л.С., Брусков В.И. Образование активных форм кислорода в воде под действием видимого и инфракрасного излучений в полосах поглощения молекулярного кислорода // Биофизика. — 2012. — Т. 57(1). — С. 5–13.
4. Межевикина Л.М., Сахарова Н.Ю., Вепринцев Б.Н. / Сборник «Проблемы сохранения и поддержания генетических коллекций лабораторных животных». — Пушино, 1991. — С. 102–112.

5. Свиридова-Чайлахян Т.А., Фахранурова Л.И., Паскевич С., Храмов Р.Н., Манохин А.А., Симонова Н.Б., Чайлахян Л.М. Фотобиомодуляция люминесцентным излучением $\lambda_{\text{max}}=626$ нм развития ранних эмбрионов мышей // Доклады Академии наук. — 2007. — Т. 417(5). — С. 710–714.
6. Ткачук В.А., Тюрин П.А., Кузьмин А.В., Белоусов В.В., Воротников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник, биологические мембраны // Биологические мембраны. — 2012. — Т. 29(1–2). — С. 21–37.
7. Чернов А.С., Решетников Д.А., Фахранурова Л.И., Манохин А.А., Давыдова Г.А., Селезнева И.И., Храмов Р.Н. Стимуляция развития ранних эмбрионов мышей под воздействием искусственного солнечного света с дополнительной люминесцентной оранжево-красной компонентой // Medline.ru. — 2013. — 14(2). — С. 295–312.
8. Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action // Free Radic. Res. — 2012. — Vol. 46(10). — P. 1280–1290.
9. Fujihara N.A., Hiraki K.N., Marques M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence // Lasers Surg. Med. — 2006. — Vol. 38. — P. 332–336.
10. Grossman N., Schneid N., Reuveni H., Halevy S., Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species // Lasers Surg. Med. — 1998. — Vol. 22. — P. 212–218.
11. Hawkins D., Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts // Photomed. Laser Surg. — 2006. — Vol. 24(6). — P. 705–714.
12. Hegele-Hartung C., Schumacher A., Fisher B. Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos: a time course study // Anat. Embryol. (Berl). — 1991. — Vol. 183(6). — P. 559–571.
13. Karu T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation // Photochem. Photobiol. — 2008. — Vol. 84. — P. 1091–1099.
14. Lavi R., Shainberg A., Friedmann H., Shneyvays V., Rickover O., Eichler M., Kaplan D., Lubart R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278(42). — P. 40917–40922.
15. Marikaw Y., Vernadeth B. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo // Mol. Reprod. Dev. — 2009. — Vol. 76(11). — P. 1019–1032.
16. Nakayama T., Noda Y., Goto Y., Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos // Theriogenology. — 1994. — Vol. 41(2). — P. 499–510.
17. Oh S.J., Gong S.P., Lee, S.T. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro // Fertil. Steril. — 2007. — Vol. 88(4). — P. 1150–1157.
18. Passarella S., Casamassima F., Molinari S. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne-laser // FEBS Lett. — 1994. — Vol. 175. — P. 95–99.
19. Passarella S., Perlino E., Quagliariello E. Evidence of changes induced by He-Ne-laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria // Bioelectrochem. Bioenerg. — 1993. — Vol. 10. — P. 185–198.
20. Roberts R.M. Embryo culture conditions: what embryos like best // Endocrinology. — 2005. — Vol. 146(5). — P. 2140–2141.
21. Roth S., Droge W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide // Cell Immunol. — 1987. — Vol. 108. — P. 417–424.
22. Schroeder P., Pohl C., Calles C., Marks C., Wild S., Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling // Free Radic. Biol. Med. — 2007. — Vol. 43. — P. 128–135.
23. Schumacher A., Fischer B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos // J. Reprod. Fertil. — 1988. — Vol. 4(1). — P. 197–204.
24. Stadler I., Evans R., Kolb B., Naim J.O., Narayan V., Buehner N., Lanzafame R.J. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes // Lasers Surg. Med. — 2000. — Vol. 27(3). — P. 255–261.
25. Tafur J., Mills P.J. Low-intensity therapy: exploring the role of redox mechanisms // Photomedicine and Laser Surgery. — 2008. — Vol. 26(4). — P. 323–328.
26. Takahashi M., Saka N., Takahashi H., Kanai Y., Schultz R.M., Okano A. Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay // Mol. Reprod. Dev. — 1999. — Vol. 54(1). — P. 1–7.
27. Takenaka M., Horiuchi T., Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104(36). — P. 14289–14293.
28. Tuby H., Maltz L., Oron U. Low-Level Laser Irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture // Lasers Surg. Med. — 2007. — Vol. 39. — P. 373–378.
29. Umaoka Y., Noda Y., Nakayama T., Narimoto K., Mori T., Iritani A. Effect of visual light on in vitro embryonic development in the hamster // Theriogenology. — 1992. — Vol. 38(6). — P. 1043–1054.
30. Yu W., Naim J.O., McGowan M., Ippolito K., Lanzafame R.J. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria // Photochem. Photobiol. — 1997. — Vol. 66(6). — P. 866–871.

INFLUENCE OF THE ARTIFICIAL TRANSFORMED SUNLIGHT ON THE PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYOS DEVELOPMENT *IN VITRO*

A.S. CHERNOV¹, D.A. RESHETNIKOV⁴, A.A. MANOHIN³, A.V. GUDKOV², R.N. KHRAMOV⁵

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute»,*

² *Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow;*

³ *Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences,*

⁴ *Pushchinsky State Natural Sciences Institute,*

⁵ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino*

Influence of the artificial sunlight, transformed by the screens with a layer of the europium-doped yttrium oxysulfide (TAS), on the preimplantation mouse embryos development *in vitro* was investigated. The irradiation of such transformed sunlight – TAS with additional fluorescent components ($\lambda_{\max} = 626 \text{ nm}$) – increases a number of normal blastocysts and decreases a number in them of dead and the apoptotic cells as compared with control. By method of the strengthened hemiluminescence in the system «luminol- ρ -iodidphenol-horseradish peroxidase» it has been established that under the influence of TAS in the cultural environment the concentration of peroxide of hydrogen increases more than by 7 times.

Keywords: blastocysts, transformed sunlight, photostimulation in early development, hydrogen peroxide.

МЕДИАТОРНЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКИХ ЗНАЧЕНИЙ БПК₅

А.С. ЗАЙЦЕВА¹, В.А. АРЛЯПОВ¹, А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1, 2*}

¹ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула;

²ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН»,
Пушино Московской области

Исследовали возможность использования различных медиаторных систем в амперометрических БПК-биосенсорах на основе микроорганизмов активного ила. Скрининг девяти медиаторов, потенциально способных к переносу электронов, показал, что ферроцен, нейтральный красный, метиленовый синий, феррицианид калия, 2,6-дихлорфенолиндофенол являются эффективными переносчиками электронов для микроорганизмов активного ила. Медиаторные биосенсоры на основе данных соединений характеризуются высокой долговременной стабильностью (от 36 до 40 суток), высокой чувствительностью (нижняя граница определяемых значений БПК₅ – 0,01 мгО₂/дм³) и экспрессностью (время анализа одной пробы не превышает 15 минут) при определении биохимического потребления кислорода (БПК). Благодаря низкой нижней границе определяемых концентраций разработанные медиаторные биосенсоры позволяют анализировать очищенные сточные воды, значения БПК₅ которых составляют менее 1 мгО₂/дм³. Наиболее перспективным медиатором для формирования медиаторного БПК-биосенсора на основе активного ила является феррицианид калия. Анализ проб воды показал, что применение медиатора феррицианида калия с микроорганизмами активного ила дает возможность получать данные, имеющие высокую корреляцию с результатами стандартного метода (R=0,9709).

Ключевые слова: биосенсор, биохимическое потребление кислорода, БПК₅, медиатор, активный ил.

Введение

Индекс биохимического потребления кислорода является основным индикатором загрязнения водных объектов органическими веществами. Стандартные методы определения БПК, регламентированные действующими нормативными документами [1, 2], основаны на измерении разности содержания растворенного кислорода до и после инкубации при установленных нормативными документами условиях. Основной недостаток методики – длительность анализа (5 суток, при определении БПК₅), что не дает возможность оперативно оценить качество природных объектов и степень очистки сточных вод. Востребованность БПК-анализа способствовала возникновению альтернативных экспресс-методов, в частности созданию биосенсорных анализаторов, позволяющих сократить время анализа с 5 суток до 10 минут [12].

Наиболее перспективный подход к созданию высокочувствительных амперометрических БПК-биосенсоров основан на использовании низкомолекулярных окислительно-восстановительных соединений, способных переносить электроны между клетками микроорганизмов и электродом (медиаторов электронного транспорта) [5–7, 9–11, 13–15]. Если такие соединения присутствуют в среде, то при окислении органических веществ аэробные микроорганизмы в качестве конечного акцептора электронов используют медиатор вместо кислорода [12]. Количество восстановленного медиатора, вырабатываемое в результате реакции биодеградации, прямо пропорционально метаболической активности (и, следовательно, количеству биоразлагаемого органического вещества), что позволяет оценить индекс БПК.

Важным этапом разработки БПК-биосенсора является выбор биоматериала. В качестве биорецепторных элементов медиаторных БПК-биосенсоров служат как чистые клетки прокариот и эукариот [6, 7, 18], так и различные консорциумы [5, 9–11, 13–15]. По сравнению с чистыми культурами, ассоциация микроорганизмов дает возможность расширения спектра биодеградируемых соединений (и, следовательно, обеспечивает более точное определение

© 2017 г. Зайцева А.С., Арляпов В.А., Решетиллов А.Н.

* Автор для переписки:

Решетиллов Анатолий Николаевич

д.х.н., проф. каф. химии ТулГУ,

зав лабораторией биосенсоров, ИБФМ им. Г.К. Скрабина РАН

E-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

БПК). Первой работой по использованию консорциума для создания медиаторных БПК-биосенсоров можно считать работу [5], в которой для создания рецепторного элемента применяли 4 штамма микроорганизмов *P. putida*, *B. licheniformis*, *T. cutaneum* и *P. vulgaris* совместно с медиатором феррицианидом калия. Верхняя граница определяемых концентраций БПК в данном биосенсоре доходит до 200 мгО₂/дм³ (без разбавления пробы), а линейная корреляция со стандартным методом анализа составляет 0,93 (на 30 образцов воды различного происхождения). В последнее время в качестве биорецепторного элемента медиаторных биосенсоров часто применяют микроорганизмы активного ила очистных сооружений [9–11, 13–15]. Активный ил служит идеальным биокатализатором для БПК анализа, поскольку он содержит разнообразное сообщество гетеротрофов, которые обеспечивают высокую долю биодеградации органических веществ. Кроме того, применение активного ила для анализа БПК регламентировано в существующих стандартных методах, поэтому его использование в биосенсорах позволяет максимально приблизить результаты экспресс-анализа к результатам стандартной 5-суточной процедуры.

В качестве медиатора для разработки БПК-биосенсоров на основе активного ила наиболее часто находят применение феррицианид калия [9, 10, 11]. Диапазон определяемых концентраций варьирует от 9,8–170 мгО₂/дм³ до 2,1–40 мгО₂/дм³ при времени анализа 360 и 240 мин, соответственно [9, 10]. Также было показано, что микроорганизмы активного ила можно задействовать и с другими акцепторами электронов [15]. Важно отметить, что большинство известных моделей БПК-биосенсоров ограничено высокой нижней границей определяемых концентраций БПК, которая варьирует в пределах 5–6 мгО₂/дм³, что не позволяет анализировать пробы поверхностных вод с предельно допустимыми значениями БПК₅ менее 2 мгО₂/дм³ [3]. Поэтому разработка высокочувствительных датчиков наиболее актуальна.

Целью настоящей работы являлось исследование возможности использования микроорганизмов активного ила в сочетании с амперометрическим графитопастовым электродом и широким спектром медиаторов электронного транспорта различного строения для создания БПК-биосенсора, обладающего высокой чувствительностью.

Материалы и методы

Реактивы и материалы. D-глюкоза («Panreac», Испания), пептон («Condra», Испания), дрожжевой

экстракт («Helicon», Россия) служили для выращивания активного ила. Графитовую пудру («Fluka», Германия), парафиновое масло («Fluka», Германия), диализную мембрану («Roth», Германия — предел пропускания 14 кДа) применяли для создания рабочего графитопастового электрода.

В качестве медиаторов электронного транспорта использовали ферроцен («Aldrich», Германия), 1,1'-диметилферроцен («Aldrich», Германия), ферроценкарбок-сальдегид («Aldrich», Германия), ферроценацетонитрил («Aldrich», Германия), нейтральный красный («Диаэм», Россия), 2,6-дихлорфенолиндофенол («Диаэм», Россия), тионин («Диаэм», Россия), метиленовый синий («Диаэм», Россия), феррицианид калия («Диаэм», Россия).

Культивирование клеток микроорганизмов. Микроорганизмы активного ила были получены с очистных сооружений ОАО «ТулаГорВодоканал» (г. Тула). Дрожжи выращивали на богатой минеральной среде (жидкая глюкозо-пептонная питательная среда). Применяли следующий состав жидкой среды: глюкоза — 10 г/дм³, пептон — 5 г/дм³, дрожжевой экстракт — 0,5 г/дм³ (Sigma, США). Среду для выращивания клеток стерилизовали автоклавированием при давлении в 1,1 атм и температуре 121 °С в течение 45 минут. Клетки выращивали аэробно 18–20 часов в качалочных колбах объемом 750 см³ при температуре 29 °С. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре 10 минут (10000 об/мин). Далее центрифугат промывали калий-натрий-фосфатным буфером (20 мМ Na₂HPO₄ и 20 мМ KН₂PO₄), рН 6,8. Осевшие клетки переносили в свежие порции буфера, распределяли по порциям и осаждали на центрифуге «Eppendorf» 5 минут при 10000 об/мин. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при температуре 25 °С.

Формирование рабочего электрода. Рабочий электрод формировали следующим образом: пластиковую трубку с площадью рабочей поверхности 6,3 мм² заполняли приготовленной пастой «графитовая пудра-минеральное масло». Электроды на основе малорастворимых медиаторов (ферроцена, 1,1'-диметилферроцена, ферроценкарбок-сальдегида, ферроценацетонитрила) формировали следующим образом. 100 мг графитовой пудры смешивали с необходимым для получения требуемой концентрации медиатора в графитовой пасте количеством 1% раствора медиатора в ацетоне. После испарения ацетона добавляли 40 мкл парафинового масла и замешивали пасту. Такой модифицированной пастой заполняли пластиковую трубку измерительного электрода. Для формирования электродов

на основе растворимых медиаторов (тионин, нейтральный красный, метиленовый синий, 2,6-дихлорфенолиндофенол, феррицианид калия) готовили немодифицированную пасту (100 мг графитовой пудры смешивали с 40 мкл парафинового масла) и также заполняли пластиковую трубку измерительного электрода.

Для иммобилизации микроорганизмов активного ила на рабочую поверхность электрода наносили 3 мкл суспензии с содержанием клеток 200 мг сырого веса/мл и подсушивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Для удерживания клеток на поверхности электрода применяли закрепляющую диализную мембрану, которую фиксировали при помощи пластикового кольца.

Биосенсорные измерения. Измерения выполняли с использованием гальванопотенциостата «РС-місго» (ООО «НТФ Вольта», Россия). Для регистрации ответов биосенсора применяли двухэлектродную схему. Рабочим электродом служил графито-пастовый с иммобилизованными клетками активного ила, электродом сравнения — насыщенный хлоридсеребряный. Электроды во время измерения погружали в ячейку с калий-натрий-фосфатным буферным раствором pH=6,8 (20 мМ Na₂HPO₄ и 20 мМ KH₂PO₄).

Рабочий потенциал варьировал в зависимости от применяемого медиатора электронного транспорта: нейтральный красный — 335 мВ, тионин — 829 мВ, метиленовый синий — 401 мВ, 2,6-дихлорфенолиндофенол — 416 мВ, 1,1'-диметилферроцен — 409 мВ, ферроценкарбоксальдегид — 601 мВ, ферроцен — 250 мВ, ферроценацетонитрил — 335 мВ, феррицианид калия — 288 мВ.

Температура измерения составляла 20 °С, объем ячейки был равен 5 см. После установления стабильного уровня тока в ячейку микропипеткой вводили необходимое для получения заданной концентрации количество раствора анализируемого вещества. После каждого измерения производили промывку ячейки буферным раствором.

Определение БПК₅ стандартным методом разбавления. В качестве референтного метода для определения БПК₅ был использован метод разбавления. Анализ проводили в соответствии с методикой, указанной в [2]. Определение содержания растворенного кислорода осуществляли с использованием БПК-термооксиметра ЭКС-ПЕРТ-001-4.0.1 (ООО «Эконикс-эксперт», Россия).

Результаты и обсуждение

Выбор медиаторов электронного транспорта

Одна из главных задач при разработке БПК-биосенсоров заключается в выборе эффективного

медиатора переноса электронов от ферментных систем микроорганизмов к электроду. Способность микроорганизмов взаимодействовать с медиаторами электронного транспорта определяется доступностью ферментных систем для этих соединений и зависит как от природы клеток, так и от строения и свойств медиатора. Для разработки БПК-биосенсора необходимо провести выбор медиаторов, способных к переносу электронов от микроорганизмов активного ила к электроду. Возможность использования соединений в качестве медиаторов определяется стандартными окислительно-восстановительными потенциалами и особенностями дыхательной цепи применяемых микроорганизмов.

Сформированные для БПК-биосенсоров системы на основе микроорганизмов активного ила и водорастворимых и малорастворимых медиаторов: тионина, нейтрального красного, метиленового синего, 2,6-дихлорфенолиндофенола, феррицианида калия, ферроцена, 1,1'-диметилферроцена, ферроценкарбоксальдегида, ферроценацетонитрила — тестировали на наличие аналитического сигнала при добавлении субстратов. Отклики биосенсоров были получены только при использовании водорастворимых медиаторов нейтрального красного, метиленового синего, феррицианида калия и 2,6 дихлорфенолиндофенола и малорастворимого медиатора ферроцена. Выбранные медиаторы были использованы в дальнейшей работе для формирования БПК-биосенсора.

Выбор рабочих параметров функционирования медиаторных БПК-биосенсоров

При разработке биосенсоров важным этапом является определение рабочих параметров, при которых генерируемый биосенсором ток будет максимальным. Величина тока, генерируемого биосенсором в присутствии субстрата, может изменяться в зависимости от условий, при которых проводятся измерения (концентрация медиатора, масса биоматериала на электроде). Количество биоматериала на электроде непосредственно влияет на параметры разрабатываемого биосенсора, однако увеличение слоя биоматериала может приводить к возникновению диффузионных ограничений как для используемого субстрата, так и для медиатора [6]. Высокая концентрация медиатора может изменять токопроводящие свойства электрода и оказывать токсическое влияние на биоматериал [4, 17].

Для выбора рабочих параметров функционирования медиаторных биосенсоров на основе активного ила получали зависимости ответов биосенсоров от массы биоматериала на электроде и от концентрации меди-

атора. Тестирование производили при использовании глюкозо-глутаматной смеси (ГГС), которая служит модельным раствором, используемым для калибровки БПК-биосенсоров [7, 18].

Величины ответов биосенсора, как показано на рисунке 1, возрастают линейно при увеличении удельной плотности биомассы (количества наносимого биоматериала на электрод площадью $6,3 \text{ мм}^2$) в диапазоне от $\approx 0,06$ до $\approx 0,10 \text{ мг/мм}^2$ вследствие того, что ток электрокаталитического окисления субстрата ферментными системами активного ила прямо пропорционален концентрации ферментов, содержащихся на единице площади поверхности электрода, что согласуется с литературными данными [8]. При дальнейшем увеличении количества биокатализатора

на поверхности электрода ответы биосенсора на основе большинства используемых медиаторов практически не увеличиваются, а в случае медиатора нейтрального красного — снижаются. Данный факт можно связать с возникающими диффузионными ограничениями для транспорта субстрата к активным центрам ферментов вследствие увеличения толщины слоя биоматериала на поверхности электрода [16]. Таким образом, биосенсоры на основе исследованных медиаторов обладают максимальным аналитическим сигналом при удельной плотности биомассы дрожжевых клеток порядка $\approx 0,16 \text{ мг/мм}^2$. Зависимости генерируемого биосенсором тока от концентрации медиатора имеют вид гиперболы (не представлены на рисунках), что согласуется с данными литературы [8, 16].

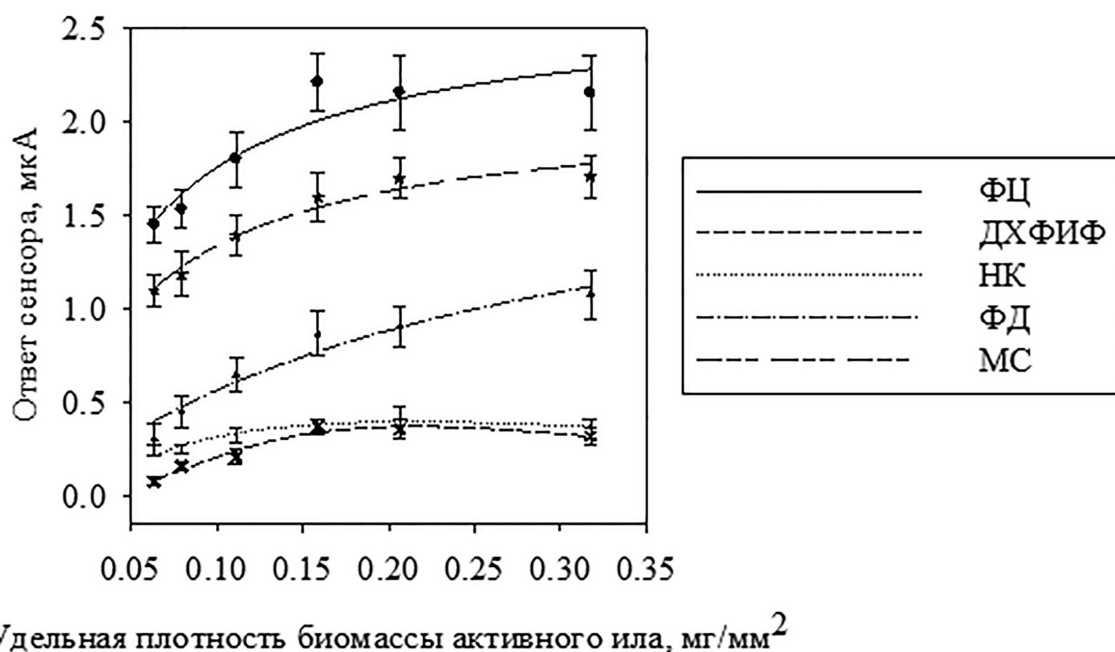


Рис. 1. Зависимость от удельной плотности биомассы ответа медиаторных биосенсоров на основе активного ила

На основе полученных зависимостей были выбраны рабочие концентрации медиаторов, при которых генерируемый в системе ток максимален: феррицианида калия — 40 ммоль/дм^3 , 2,6-дихлорфенолиндифенола — $0,1 \text{ ммоль/дм}^3$, метиленового синего — $0,06 \text{ ммоль/дм}^3$, нейтрального красного — 1 ммоль/дм^3 , ферроцена — 107 ммоль/дм^3 (в ацетоне для приготовления пасты). Дальнейшие исследования проводили при указанных рабочих параметрах.

Аналитические и метрологические характеристики разработанных медиаторных БПК-биосенсоров

В ходе выполнения работы были созданы биосенсоры для экспресс-анализа БПК на основе исследуемых медиаторов и активного ила.

Для построения градуировочных кривых был использован раствор глюкозы и глутаминовой кислоты с конечными концентрациями 150 мг/л каждого компонента. Значение БПК₅ модельного раствора составляет $205 \text{ мгO}_2/\text{дм}^3$ [2] (рис. 2).

Исходя из того, что биоэлектроды на основе целых клеток микроорганизмов являются биорецепторами каталитического типа, то есть аналитический сигнал в таких системах обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов, полученные зависимости, приведенные на рисунке 2, были описаны уравнением Михаэлиса — Ментен:

$$R = \frac{R_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

где R_{\max} — максимальная скорость ферментативной реакции, достигаемая при $[S] \rightarrow \infty$, K_M — эффективная константа Михаэлиса, то есть концентрация субстрата, при которой $R = R_{\max} / 2$.

Для дальнейшего применения биоэлектродов для анализа БПК был выделен линейный участок градуировочной зависимости, ограниченный сверху константой K_M , а нижней границей линейного диапазона стало значение БПК градуировочной кривой, при котором относительное стандартное отклонение ответа сенсора составляло не более 0,33. В таблице 1 представлены основные аналитические и метрологические характеристики медиаторных биосенсоров на основе активного ила. На основе анализа метрологических и аналитических

характеристик, приведенных в таблице 1, можно сделать вывод о том, что разработанные медиаторные биосенсоры достаточно перспективны для анализа БПК. Биосенсоры позволяют получать стабильный аналитический сигнал — операционная стабильность (относительное стандартное отклонение) не превышает 5%. Высокая долговременная стабильность (до 36 суток) обеспечит высокий срок эксплуатации рабочих электродов, за исключением медиаторного биосенсора на основе 2,6-дихлорфенолиндофенола. Применение данного медиатора для определения БПК нецелесообразно, так как рабочий электрод необходимо будет заменять каждую неделю. В связи с этим биосенсор на основе медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола далее не рассматривается; кроме того, из рассмотрения исключен медиатор ферроцен, так как биосенсор, получаемый на его основе, характеризуется узким диапазоном определяемых концентраций БПК.

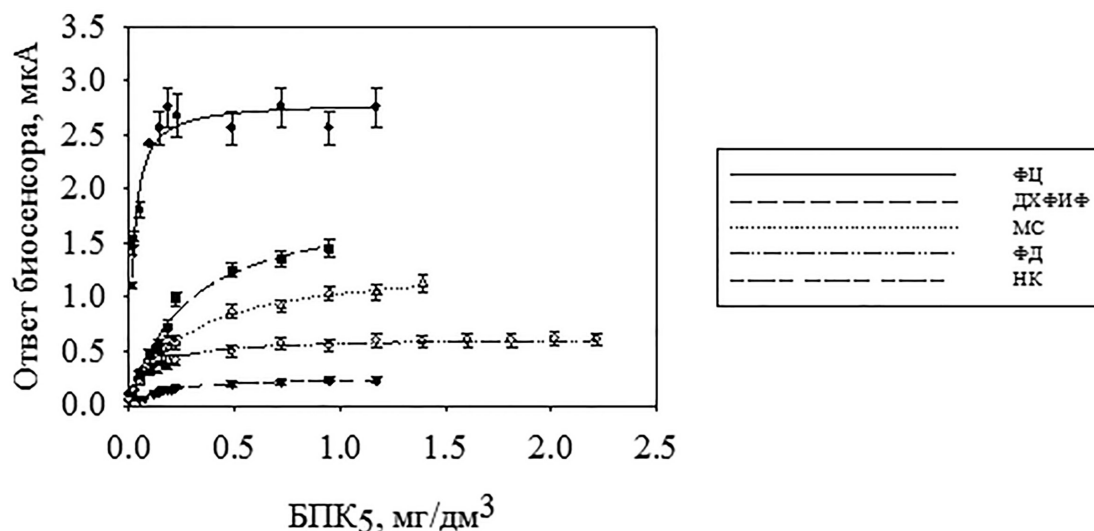


Рис. 2. Зависимость ответа биосенсоров от БПК₅ в измерительной кювете в присутствии медиаторов

Таблица 1

Характеристики медиаторных биосенсоров на основе активного ила

Характеристика	ФЦ*	ФД	НК	МС	ДХФИФ
Операционная стабильность, %	4,7	3,8	2,5	0,7	2,5
Долговременная стабильность, сутки	49	53	58	36	5
Длительность единичного измерения, мин	8–15	4–6	5–11	5–10	5–7
Диапазон определяемых концентраций БПК, мгО ₂ /дм ³	0,01–0,06	0,01–0,23	0,01–0,14	0,02–0,4	0,01–0,21
Предел обнаружения, мгО ₂ /дм ³	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003

Примечание: ФЦ* — ферроцен, ФД — феррицианид калия, НК — нейтральный красный, МС — метиленовый синий, ДХФИФ — 2,6-дихлорфенолиндофенол

Важно отметить, что разработанные биосенсоры по своим характеристикам не только не уступают зарубежным аналогам [3, 5–7, 9–11, 13–15], но и частично превосходят их: нижняя граница определяемых концентраций разработанных биосенсоров дает возможность проводить анализ очищенных сточных вод, где значение БПК составляет менее $1 \text{ мгО}_2/\text{дм}^3$.

Для обеспечения корреляции результатов биосенсорного и стандартного методов анализа необходимо,

чтобы используемый рецепторный элемент окислял широкий спектр органических соединений, то есть обладал низкой селективностью. Исходя из этого, была оценена субстратная специфичность исследуемых клеток активного ила в условиях электрокаталитического окисления субстратов при использовании разных медиаторов в сравнении с их дыхательной активностью в присутствии естественного акцептора электронов — кислорода. Результаты приведены на рисунке 3.

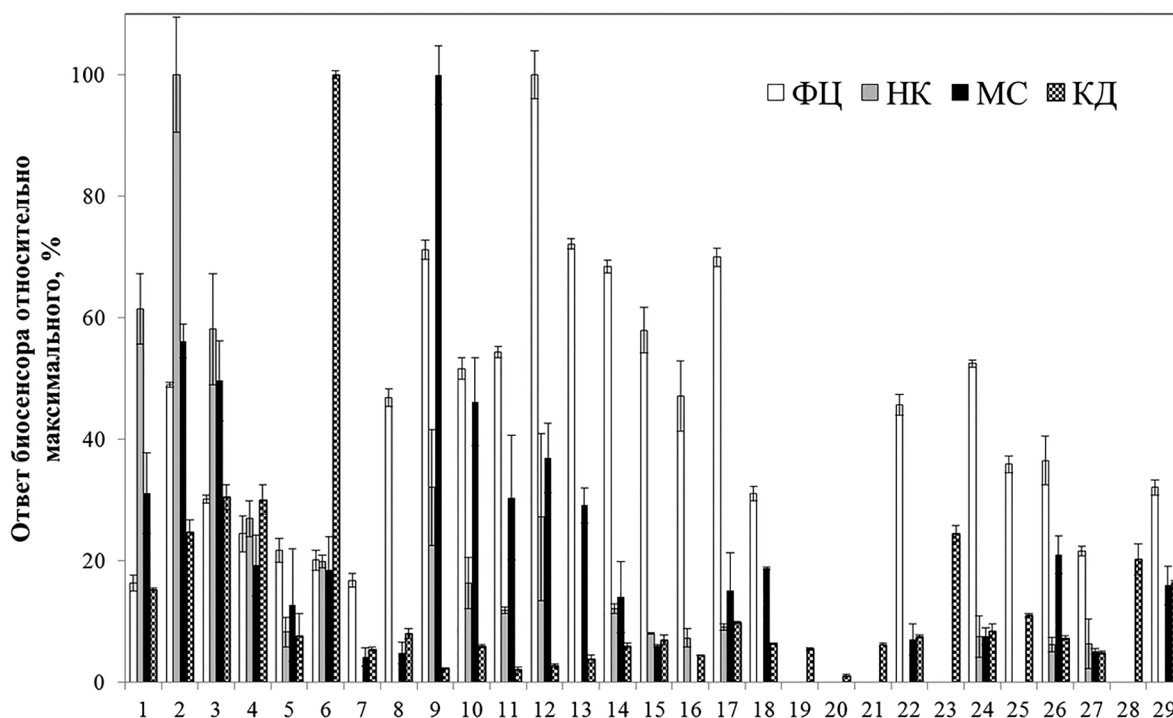


Рис. 3. Селективность рецепторных элементов на основе активного ила в присутствии ФЦ — феррицианида калия, НК — нейтрального красного, МС — метиленового синего и КД — кислорода как акцепторов электрона при окислении субстратов: 1 — ксилоза, 2 — глюкоза, 3 — галактоза, 4 — манноза, 5 — фруктоза, 6 — сахароза, 7 — лактоза, 8 — метанол, 9 — этанол, 10 — пропанол-1, 11 — бутанол-1, 12 — 2-метилбутанол-4, 13 — глицерин, 14 — сорбит, 15 — муравьиная кислота, 16 — уксусная кислота, 17 — малоновая кислота, 18 — янтарная кислота, 19 — лимонная кислота, 20 — L-глутаминовая кислота, 21 — L-тирозин, 22 — L-серин, 23 — формалин, 24 — 2,4-динитрофенол, 25 — ЭДТА, 26 — додецилсульфат натрия

Анализ профилей субстратной специфичности, представленных на рисунке 3, позволяет сделать вывод о том, что тенденции электрокаталитического окисления углеводов активным илом в присутствии различных медиаторов сходны. Следует отметить, что применение медиатора нейтрального красного для разработки БПК-биосенсора нецелесообразно, поскольку отсутствует ответ сенсора на глутаминовую кислоту, входящую в состав модельного раствора глюкозо-глутаматной смеси. Активный ил в присутствии остальных медиаторов способен метаболизировать аминокислоты, карбоновые

кислоты, формальдегид, компоненты моющих средств. В результате оценки субстратной специфичности можно отметить, что наиболее широкий круг субстратов можно зарегистрировать рецепторным элементом на основе активного ила в присутствии медиатора феррицианида калия. На основании этого факта можно предположить, что при определении БПК реальных образцов можно получить высокую степень корреляции между показаниями биосенсора и результатами стандартного метода; поэтому именно медиатор феррицианид калия был выбран для анализа водных проб различного происхождения.

Анализ образцов воды с использованием разработанного биосенсора

Проведен анализ девяти образцов воды с использованием разработанного биосенсора на основе феррицианида калия и стандартного метода разбавления. Были отобраны пробы речной воды, сточных вод городских очистных сооружений до и после очистки, талых вод. Определение БПК₅ проб стандартным методом разбавления проводилось согласно действующим нормативным документам [2].

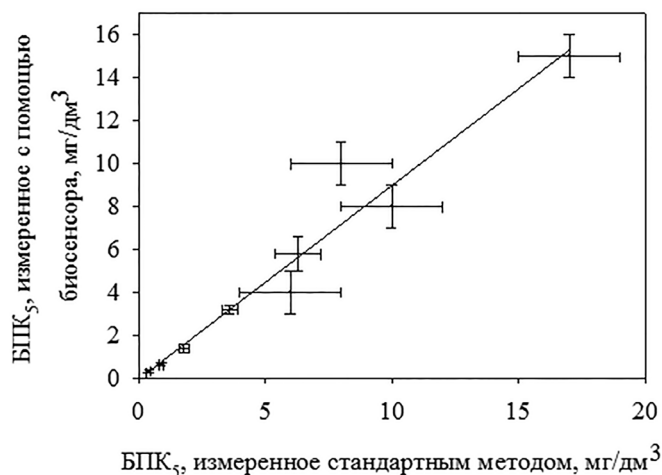


Рис. 4. Корреляция между значениями БПК₅, определенными с помощью разработанного биосенсора на основе активного ила и медиатора феррицианида калия и значениями БПК₅, определенными стандартным методом

На рисунке 4 показана корреляция между значениями БПК₅ образцов воды, определенными с помощью медиаторного биосенсора, и значениями БПК₅, определенными стандартным методом разбавления.

Статистическая обработка полученных данных (модифицированный тест Стьюдента) показывает, что результаты анализа стандартным методом разбавления и биосенсорным методом незначимо различаются между собой. Таким образом, разработанный медиаторный биосенсор на основе активного ила и медиатора феррицианида калия можно эффективно использовать для анализа различных образцов воды.

Заключение

В результате изучения возможности использования растворимых и малорастворимых медиаторов в составе биосенсора на основе активного ила выявлено, что из девяти медиаторов для данных целей применимы только пять. Разработанные медиаторные биосенсоры на основе активного ила характеризуются высокой долговременной

стабильностью (до 36 суток, за исключением медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола), селективностью, чувствительностью (нижняя граница определяемых концентраций составляет 0,01 мгО₂/дм³) и экспрессностью (время замера одной пробы не превышает 15 минут) при определении БПК. Наиболее перспективным медиатором для формирования медиаторного БПК-биосенсора на основе активного ила является феррицианид калия. Разработанный БПК-биосенсор превосходит многие известные аналоги по чувствительности и дает возможность проводить мониторинг качества поверхностных вод категории «очень чистые» (БПК₅ менее 1 мгО₂/дм³). Показано, что медиаторный биосенсор на основе феррицианида калия и микроорганизмов активного ила открывает возможность получать данные с высокой корреляцией со стандартным методом (R=0,9709).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и Правительства Тульской области № 16-48-710959 р_а (договор ДС/44) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК.

Литература

1. МВИ 224.01.17.133.2009 Методика выполнения измерений биохимического потребления кислорода в природных и сточных водах по изменению давления газовой фазы (манометрический метод). — М.: 2009. — 16 с.
2. ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПК_{полн}) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. — М.: 1997. 25 с.
3. СанПиН 2.1.5.980-00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. — М.: 2000. 10 с.
4. Babkina E., Chigrinova E., Ponamoreva O., Alferov V., Reshetilov A. Bioelectrocatalytic oxidation of glucose by immobilized bacteria *Gluconobacter oxydans*. Evaluation of water-insoluble mediator efficiency // *Electroanalysis*. — 2006. — Vol. 18. — No. 19–20. — P. 2023–2029.
5. Catterall K., Zhao H., Pasco N., John R. Development of a rapid ferricyanide-mediated assay for biochemical oxygen demand using a mixed microbial consortium // *Anal. Chem.* — 2003. — Vol. 75. — No. 11. — P. 2584–2590.
6. Hooi K.B., Ismail A.K., Ahamad R., Shahir S. A redox mediated UME biosensor using immobilized *Chromobacterium violaceum* strain R1 for rapid biochemical oxygen demand measurement // *Electrochim. Acta*. — 2015. — Vol. 176. — P. 777–783.

7. Hu J., Gao G., Xia S. Development of a mediator-type bioelectrochemical sensor based on polypyrrole immobilized ferricyanide and microorganisms for biochemical oxygen demand fast detection // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2015. – Vol. 10. – No. 11. – P. 9695–9705.
8. Ikeda T., Kurosaki T., Takayama K., Kano K. Measurements of oxidoreductase-like activity of intact bacterial cells by an amperometric method using a membrane-coated electrode // *Analytical Chemistry*. – 1996. – Vol. 68. – No. 1. – P. 192–198.
9. Jordan M.A., Welsh D.T., John R., Catterall K., Teasdale P.R. A sensitive ferricyanide-mediated biochemical oxygen demand assay for analysis of wastewater treatment plant influents and treated effluents // *Water Res.* – 2013. – Vol. 47. – No. 2 – P. 841–849.
10. Jordan M.A., Welsh D.T., Teasdale P.R., Catterall K., John R. A ferricyanide-mediated activated sludge bioassay for fast determination of the biochemical oxygen demand of wastewaters // *Water Res.* – 2010. – Vol. 44. – No. 20. – P. 5981–5988.
11. Jordan M.A., Welsh D.T., Teasdale P.R. Ubiquity of activated sludge ferricyanide-mediated BOD methods: A comparison of sludge seeds a cross wastewater treatment plants // *Talanta*. – 2014. – Vol. 125. – P. 293–300.
12. Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review // *Water research*. – 2014. – Vol. 49. – P. 62–82.
13. Liu L., Bai L., Yu D., Zhai J., Dong S. Biochemical oxygen demand measurement by mediator method in flow system // *Talanta*. – 2015. – Vol. 138. – P. 36–39.
14. Liu L., Deng L., Yong D., Dong S. Native biofilm cultured under controllable condition and used in mediated method for BOD measurement // *Talanta*. – 2011. – Vol. 84. – No. 3. – P. 895–899.
15. Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkula P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in aporous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – Vol. 241. – P. 473–481.
16. Richardson N.J., Gardner S., Rawson D.M. A chemically mediated amperometric biosensor for monitoring eubacterial respiration // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1991. – Vol. 70. – No. 5. – P. 422–426.
17. Trosok S.P., Driscoll B.T., Luong J.H.T. Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 56. – No. 3–4. – P. 550–554.
18. Zaitseva A.S. Arlyapov V.A., Yudina N.Yu., Alferov S.V., Reshetilov A.N. Use of one-and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2016. – Vol. 98. – P. 43–51.

MEDIATOR BIOSENSOR BASED ON MICROORGANISMS OF ACTIVATED SLUDGE FOR RAPID DETERMINATION OF LOW BOD₅ VALUES

A.S. ZAITSEVA¹, V.A. ARLYAPOV¹, A.N. RESHETILOV^{1,2}

¹ *Tula State University», Tula;*

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

The possibility of using various mediator systems in amperometric BOD-biosensors based on microorganisms of activated sludge was investigated. Screening of nine mediators potentially capable of electron transfer showed that ferrocene, neutral red, methylene blue, potassium ferricyanide, 2,6-dichlorophenolindophenol are effective carriers of electrons for active sludge microorganisms. Mediator biosensors based on these compounds are characterized by high long-term stability (from 36 to 40 days), high sensitivity (the lower limit of the measured BOD₅ values is 0.01 mgO₂/dm³) and the expressness (the analysis time of one sample does not exceed 15 minutes) in determination of biochemical oxygen demand (BOD). Due to the low lower limit of the detected concentrations, the developed mediator biosensors allow analyzing treated wastewater, the BOD₅ values of which are less than 1 mgO₂/dm³. The most promising mediator for the formation of a mediator BOD-biosensor based on activated sludge is potassium ferricyanide. Analysis of water samples showed that the use of a potassium ferricyanide mediator with active sludge microorganisms makes it possible to obtain data having a high correlation with the results of the standard method (R=0.9709).

Keywords: biosensor, biochemical oxygen demand, BOD₅, mediator, active sludge.

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В ГИДРОЗОЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

А.Г. МЕШАНДИН*, В.С. БОЛДЫРЕВ

Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана

Представлены результаты применения антигенов *M. tuberculosis* в сочетании с коллоидными твёрдыми фазами в синтезе гидрозольных препаратов для экспрессной иммунодиагностики. Метод может быть использован для проведения анализов в медицинской и сельскохозяйственной отраслях и обеспечивать экспресс-диагностику в пределах 0,5–3,0 минут.

Ключевые слова: антигены, антитела, экспрессный гидрозольный иммуноанализ.

Введение

При развитии патологического состояния в организме человека либо животных в их биологических жидкостях: крови, моче, слюне — появляются определенные маркеры: специфические вещества сложной, в том числе белковой природы. При обнаружении тех или иных маркеров врач, либо ветеринарный врач может судить о факте заболевания. В ряде случаев это удается тогда, когда больной не подозревает о начале и развитии болезни. Следовательно, необходимо внедрять в практическую деятельность клиники новые экспрессные методы ранней диагностики. В распоряжении любого врача-клинициста должны быть диагностические препараты, позволяющие осуществить хотя бы качественную диагностику (по принципу «да-нет») с последующим более полным исследованием в случае «да» конкретной патологии, соответствующей его специальности.

Эти препараты должны быть дешевы, экспрессны — постановка реакции и считывание результатов не более 1–2 минут, не требовать дополнительных приборов (возможность проводить реакции непосредственно на рабочем месте, либо у постели больного, в карете скорой помощи, в полевых условиях), возможность ставить реакции с малыми объемами препарата и биоматериала, взятого у больного (10–20 мкл). Кроме того, они должны иметь стабильные и воспроизводимые

иммунохимические свойства, то есть выявлять маркеры того или иного заболевания в самом широком спектре биологических жидкостей (моче, слюне, сыворотке крови и т.д.) в минимальных концентрациях. В настоящее время иммунохимические методы далеки от сформулированных выше требований. Для большинства из них характерны отсутствие экспрессности, высокая стоимость одного анализа, требуются дорогостоящие приборы.

Представляемые в настоящем исследовании гидрозольные препараты являются коллоидными растворами частиц неорганической природы, на поверхности которых по определенной технологии адсорбированы биоспецифические лиганды (антигены, антитела). При последующем смешении с жидкостью в подлежащих тестированию биоматериалах (сыворотка крови, слюна, объекты смыва из окружающей среды и т.д.) в случае положительной реакции происходит агглютинация, видимая невооруженным глазом. Такая процедура позволяет проводить анализы медицинского, сельскохозяйственного, экологического и биотехнологического профиля практически без каких-либо приборов, в условиях самой простой лаборатории, полевых условиях и т.д., причем время постановки анализа составляет от 30 секунд до 2–3 минут.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись гидрозольные реагенты, используемые в реакции гидрозольной агглютинации (РГЗА).

Для исследования нами были изготовлены гидрозоли, нагруженные нативными и генно-инженерными антигенами с целью выявления антител в сыворотке крови, состав которых был следующим:

© 2017 г. Мешандин А.Г., Болдырев В.С.

* **Автор для переписки:**

Мешандин Алексей Гаврилович

доктор технических наук,

профессор кафедры химии МГТУ им. Н.Э. Баумана

E-mail: agim51@yandex.ru

I. Твердофазные носители (табл. 1):

Таблица 1

Твердофазные носители в качестве основы для гидрозольных диагностикумов

№	Тип носителя, формула	Плотность, г/см ³	Размер частиц, нм	Цвет
1.	Гексацианферрат (II) железа (III) или берлинская лазурь $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$	1,92	80–200	Синий
2.	Оксид железа Fe_3O_4	4,73	200–500	Коричневый

II. Модификатор для твердой фазы гидрозольных диагностикумов HgCl_2 .

III. Биолиганды (табл. 2):

Таблица 2

Биолиганды, используемые в РГЗА

№	Тип биолиганда	Область применения
1.	Рекомбинантные антигены туберкулеза, полученные с помощью генно-инженерных технологий (BL(DT3)/pCFP-ESAT), Покровский завод биопрепаратов, Владимирская область	Для диагностики туберкулеза <i>in vivo</i>
2.	Комплексный туберкулезный антиген — диагностикум ППД производства Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова	Для диагностики туберкулеза <i>in vivo</i>

Методика изготовления гидрозолей для исследования состояла из нескольких этапов. Сначала выполняли синтез твердых фаз: $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ и Fe_3O_4 . Далее твердые фазы модифицировали 2% HgCl_2 , после чего осуществляли хемосорбцию исследуемых биолигандов.

Объекты исследований. Для исследования в качестве биологических материалов использовали сыворотки крови больных людей с верифицированным диагнозом «Туберкулез» и сыворотки крови здоровых доноров.

Принцип реакции гидрозолевой агглютинации заключался в следующем: протекающая на молекулярном уровне реакция взаимодействия антигена с антителом должна приводить к развитию явлений, доступных наблюдению невооруженным глазом. Эту задачу удается решить, опираясь на факты множественности антигенных детерминант, а также на наличие двух областей связывания антигена у каждой молекулы антитела. Если коллоидные частицы нагрузить антигенами, то в силу бивалентности

комплементарных антител происходит их связывание или агглютинация. Образование даже небольших агрегатов приводит к их быстрому и хорошо заметному осаждению из коллоидного раствора с потерей последним агрегативной устойчивости. При смешивании разбавленных сывороток или капиллярной крови с коллоидным раствором таких поливалентных частиц даже ничтожная концентрация антител в сыворотке крови достаточна для возникновения заметной агглютинации. При визуализации реакции на фильтровальной бумаге «красная лента» мы получали следующую картину: при положительной реакции — плотный, компактный комплекс с четкой границей; при отрицательной реакции — распределение частиц реагирующих веществ без четкой границы в виде пятна.

Для постановки РГЗА использовали U-образные иммунологические планшеты, в лунках которых разводили и титровали сыворотки крови. Затем вносили равные аликвоты гидрозоля, перемешивали с помощью пипеточного дозатора. Через 3–5 минут осуществляли регистрацию результатов в планшете и на пористом носителе — фильтровальной бумаге (рис. 1).

Для сравнения мы применяли следующие референс-методы: микробиологические методы (микроскопия мазка и культуральный метод). Полученные результаты обработаны статистическими методами. При сравнении качественных признаков применялся критерий Мак-Нимара, при помощи метода распределения χ^2 (хи-квадрат) определяли теоретическую частоту положительных результатов эксперимента при равномерном распределении. Для выявления вида зависимости титра от концентрации применялся регрессионный анализ.

Общие принципы методологии исследования и отдельные детали приведены в работах авторов с коллегами [1–5].

Результаты

Исследование гидрозольных препаратов в задачах выявления специфических антител к *M. tuberculosis*. Работа проводилась в 3 этапа. На первом этапе формировали панели сывороток крови, взятых от 16 пациентов с установленным диагнозом «Туберкулез», подтвержденным клинико-лабораторными методами. Из них 90,0% от бацилярных больных с активной формой легочного туберкулезного процесса и 10,0% от пациентов с внелегочной формой туберкулеза (туберкулез среднего уха, мочевого пузыря, лимфаденит).

В качестве контрольной группы взяли 48 образцов сывороток здоровых доноров, в возрасте от 25 до 55 лет.

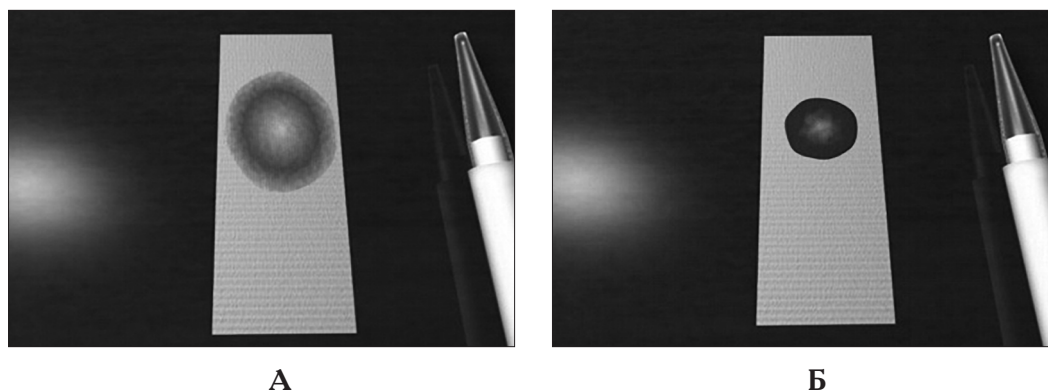


Рис. 1. Визуализация результатов на фильтровальной бумаге. А — отрицательная сыворотка, Б — положительная сыворотка. *Примечание:* гидрозоль окрашен в синий цвет

РГЗА проводилась как на основе берлинской лазури, так и оксида железа (Fe_3O_4). В каждом случае синтезировали гидрозоль с нативными антигенами ППД (Purified Protein Derivative) и рекомбинантными антигенами туберкулеза (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT) по вышеуказанной методике.

Получали четыре вида гидрозоль: гексацианферрат железа с адсорбированным рекомбинантным антигеном туберкулеза (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT),

гексацианферрат железа с ППД антигеном, оксид железа (Fe_3O_4) с рекомбинантным антигеном туберкулеза (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT), оксид железа (Fe_3O_4) с ППД антигеном.

Предварительно исследуемые сыворотки крови больных и здоровых доноров титровали от 1:20 до 1:2560.

Данные, полученные при изучении серопозитивных и серонегативных результатов к *M. tuberculosis*, представлены на рисунке 2.

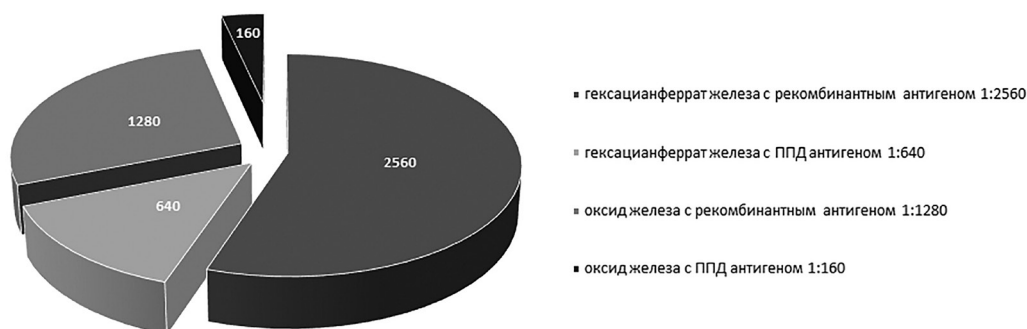


Рис. 2. Сравнение гидрозольных диагностикумов для детекции антител к возбудителю туберкулеза с различными биолигандами в РГЗА

Результаты постановок на первой панели показали, что все 4 гидрозоль фиксируют наличие специфических антител к *M. tuberculosis* в 16 пробах. Наиболее высокие титры в серопозитивных пробах были выявлены с гидрозольми на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe_3O_4) с адсорбированными рекомбинантными антигенами (1:2560 и 1:1280, соответственно, $p < 0,001$). В сравнении с гидрозольми на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe_3O_4) с адсорбированным нативным антигеном титры антител были ниже (1:640 и 1:160, соответственно, $p < 0,05$). При анализе показателей выявления титров специфических антител к *M. tuberculosis* установлены наиболее выраженные отличия в РГЗА с гидрозольми на основе

берлинской лазури с адсорбированными рекомбинантными антигенами.

На втором этапе, учитывая данные первых испытаний для реакции гидрозольной агглютинации, использовали только два гидрозоль с рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT), которые адсорбировали и на берлинскую лазурь, и на оксид железа (Fe_3O_4). Мы изучали панели сывороток от 20 больных с верифицированным диагнозом «Туберкулез», 20 здоровых доноров. Параллельно у 10 из них была исследована капиллярная кровь. При сравнении показателей, полученных в РГЗА, были обнаружены наиболее выраженные достоверные отличия между двумя гидрозольми. Гидрозоль на основе оксида железа

(Fe₃O₄) с адсорбированными рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT) в данном испытании в капиллярной крови не сработал, а в сыворотке крови проявил слабую агглютинабельность — 10,0% от общего количества обследуемых. По результатам этой серии испытаний высокую чувствительность и специфичность показал гидрозольный препарат на основе берлинской лазури с рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT) как в сыворотке, так и в капиллярной крови. Реакцию агглютинации наблюдали со всеми сыворотками от 20 пациентов в разведении 1:1000 и с капиллярной кровью от 10 больных — в разведении 1:100. В данном случае с целью сравнения двух качественных признаков: «есть» или «нет», определенных у одних и тех же больных, была проведена статистическая обработка по критерию Мак-Нимара. В итоге было выявлено, что экспериментальные значения критерия больше критического, с вероятностью ошибки менее 0,01 (<1%). Таким образом, можно с достоверностью более 99% (мощность критерия >0,09) утверждать, что предложенный метод диагностики позволяет выявить антитела к *M. tuberculosis* при различной локализации возбудителя.

На третьем этапе для подтверждения результативности РГЗА в выявлении противотуберкулезных антител нами было проведено сравнение данных в параллельных исследованиях в качественных тестах: в реакции гидрозольной агглютинации. Проведено тестирование 44 проб (сывороток крови) от больных различными формами туберкулеза с разной локализацией и бактериологически подтвержденным диагнозом. В контрольную группу вошли 40 образцов, из которых взяли: 20 пациентов с заболеваниями сходных локализаций, но не имеющих туберкулеза в анамнезе (больные с хроническими бронхитами, бронхиальной астмой и другие); 20 — здоровые доноры. В данном случае в РГЗА использовали оптимальный, с нашей точки зрения, гидрозоль — берлинскую лазурь с адсорбированными рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT). Постановка осуществлялась с заведомо положительными и отрицательными сыворотками крови в титрах 1:20–1:200 по вышеописанной методике. Обобщение полученных результатов обследования здоровых и больных лиц туберкулезом приведено в таблице 3.

При сравнении полученных данных исследования и нами изготовленного гидрозольного реагента установлен следующий факт. Указанный реагент показал чувствительность 91% (40/44) и специфичность 98% (39/40), а также хорошую корреляцию результатов с данными культурального и микробиологического методов (общая

согласованность данных = 96,6%). В ходе работы мы провели сравнительный анализ результатов традиционных и экспресс-анализов и их технико-экономическое обоснование, которые демонстрируют явные преимущества применения реакции гидрозольной агглютинации в выявлении антител к микобактериям туберкулеза.

Таблица 3

Обобщение полученных серопозитивных и серонегативных результатов в РГЗА

Культуральный и микробиологический методы	Реакция гидрозольной агглютинации (РГЗА)	
	Положительный	Отрицательный
Положительный: 44 сыворотки	40	4
Отрицательный: 40 сывороток	39	1
Общий результат: 84 сыворотки	79	5
Чувствительность	91% (40/44)	
Специфичность	98% (39/40)	

Таким образом, в ходе работы было выявлено, что наиболее эффективным экспрессным диагностиком в выявлении антител к *M. tuberculosis* как в сыворотке крови, так и в капиллярной крови является гидрозоль гексацианферрат II железа III (берлинская лазурь), с адсорбированными рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT).

Заключение

Проведенное исследование дает возможность сделать следующие выводы:

1. Разработан и апробирован новый иммунохимический метод гидрозольной агглютинации на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe₃O₄) для выявления специфических антител к возбудителям туберкулеза как в сыворотке крови, так и в капиллярной крови.
2. Гидрозольные диагностикумы с нативным и генно-инженерным антигеном применимы в случае выявления антител к *M. tuberculosis*. При сравнении гидрозолей различного состава были обнаружены преимущества использования препарата на основе берлинской лазури с генно-инженерным антигеном.

Литература

1. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. Диагностические препараты на основе коллоидного раствора гексакианферрата железа и оксида железа / Сборник научных трудов. Самара: СГМУ, 2010. — Самара, 2010, — С. 263–264.
2. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. и др. Усовершенствование методик выявления инфекционных и соматических патологий при помощи реакции гидрозольной агглютинации // Информационный лист № 43-024-08. — Киров: ЦНТИ, 2008. — С. 1–2.
3. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. Изучение коллоидных растворов на основе гексакианферрата железа в качестве возможных диагностических препаратов // Вятский медицинский вестник. — Киров: КГМА, 2009. — № 1. — С. 111.
4. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. Экспрессный бесприборный метод гидрозольной агглютинации // Вестник РГМУ. — 2010. — Специальный выпуск 2. — С. 536–537.
5. Попова С.В., Мешандин А.Г., Плехов В.Л., Якимова О.Н. Использование гидрозольных препаратов в качестве экспрессных бесприборных диагностикумов в выявлении антител к *M. tuberculosis* / Сб. Материалов Пятого съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: Москва 2–4 декабря 2008 г. Под ред. Р.Г. Василовой. — Москва: ГОУ ВПО МГУЛ, 2009. — С. 283–284.

THE USE OF VARIOUS ANTIGENS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN HYDROSOL PREPARATIONS FOR RAPID IMMUNODIAGNOSTICS

A.G. MESHANDIN, V.S. BOLDYREV

Bauman State Technical University, Moscow, Russia

The results of application of *M. tuberculosis* antigens in combination with colloidal solid phases in the synthesis of hydrosol preparations for rapid immunodiagnosics are presented. The method can be used for analysis in the medical and agricultural industries and provide express diagnostics within 0.5–3.0 minutes.

Keywords: antigens, antibodies, express hydrosol immunoassay.

ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК БИОСЕНСОРОВ И БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

С.Е. ТАРАСОВ*, Ю.В. ПЛЕХАНОВА, А.Н. РЕШЕТИЛОВ

*ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН»,
Пушино, Московская область*

В обзоре представлены современные подходы к электрохимической регистрации процессов, происходящих в биосенсорах и биотопливных элементах, с помощью метода импедансной спектроскопии. Рассматриваются описанные в литературе биосенсоры на основе электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС) и возможность применения ЭИС для изучения характеристик микробных и ферментных биотопливных элементов.

Ключевые слова: импеданс, биосенсор, электрохимическая импедансная спектроскопия, биотопливный элемент, биоэлектрохимия.

Введение

Особое внимание исследователей в последние годы приковано к электрохимическим системам, содержащим в своем составе биоматериалы (клетки, клеточные органоиды, ферменты, ДНК и т.д.). В первую очередь, к подобным системам следует отнести биосенсоры и биотопливные элементы (БТЭ). Принцип работы этих устройств похож. В то время как биосенсоры предназначены для определения искомым соединений с помощью методов молекулярного распознавания биообъектов [44], биотопливные элементы генерируют электрическую энергию с помощью биокаталитических реакций [28].

Ключевой особенностью обоих типов устройств является сочетание в них биологической части и электрохимических преобразователей, и именно из-за данной сложности строения таких систем к их изучению необходимо подходить с особой тщательностью. Изучать биоэлектрохимические устройства можно с разных сторон и различными методами: спектроскопическими, биологическими, аналитическими или электрохимическими [24]. Например, сканирующая электронная микроскопия полезна при наблюдении за биопленками на поверхности анода биорецептора; биохимические методы

легко позволяют определить оптимальную концентрацию редокс-медиаторов в системе, необходимую для работы биосенсоров, тогда как электрохимические методы помогают изучать влияние отдельных компонентов системы на электрические процессы, происходящие на поверхности электродов [37].

Электрохимические методы анализа можно назвать важнейшей группой методов для характеристики биоэлектрохимических систем. К наиболее часто используемым методам относятся дифференциальная импульсная вольтамперометрия и циклическая вольтамперометрия, используемые для характеристики процессов электронного переноса в системе. Циклическая вольтамперометрия становится незаменимым методом в случае, если медиаторный электронный перенос является доминирующим способом переноса электронов в системе. В некоторых случаях требуется применение дополнительных методов, например, методов высокоэффективной жидкостной хроматографии, для наблюдений за количеством выделяемых в процессе работы БТЭ продуктов.

В последние 10–15 лет активно проводятся исследования с использованием такого метода, как электрохимическая импедансная спектроскопия. Электрохимическая импедансная спектроскопия является мощным неdestructивным инструментом для исследования электрохимических систем, но в основном при изучении коррозии, батарей и топливных элементов [18]. Использование ЭИС для изучения биологических систем находится на достаточно ранних стадиях, но у метода исследования есть большой потенциал в данной области. При изучении биосенсоров метод ЭИС стал приме-

© 2017 г. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Решетиллов А.Н.

* **Автор для переписки:**

Тарасов Сергей Евгеньевич

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

Пушино, Московская область

E-mail: setar25@gmail.com

няться в сочетании с вольтамперометрией в качестве дополнительного метода при исследовании ферментных сенсоров [8, 16], но в дальнейшем появились и сенсоры, использующие импедансометрический отклик системы на субстрат. Использование же метода ЭИС для изучения БТЭ выглядит логичным, так как этот метод крайне популярен при анализе традиционных топливных элементов. К преимуществам метода следует отнести, например, то, что в ЭИС на систему воздействует переменный ток очень малой величины, и ответ системы на воздействие наблюдается в стационарном состоянии, в то время как в вольтамперометрии электрод приводится в далекое от равновесного состояние в процессе измерений [12]. Другим серьезным преимуществом ЭИС является то, что этот метод не деструктивен и не мешает нормальной работе биоэлектрохимической системы при проведении измерений. Таким образом, при использовании ЭИС параметры работающего БТЭ не меняются извне.

В целом, можно сказать, что импедансная спектроскопия представляет собой существенное дополнение к известным биохимическим и спектроскопическим методам анализа при изучении и оптимизации электрохимических параметров биологических систем. Цель настоящей работы состоит в осуществлении обзора современных импедансометрических биосенсоров, а также особенностей использования электрохимической импедансной спектроскопии для изучения биотопливных элементов.

Теоретические основы импеданса

По закону Ома, сопротивление (R) — это величина, обратная проводимости электрического тока через проводник, равная отношению напряжения (U) к силе тока (I). Однако, кроме стандартного электрического сопротивления, есть еще два механизма, описывающих поведение зарядов в электрической цепи: способность элемента накапливать электрический заряд, выражаемая емкостью (C), и магнитные свойства электрических цепей, выражаемые индуктивностью (L) [2]. В сумме величины индуктивного и емкостного сопротивлений дают значение реактивного сопротивления (X), которое при сложении с активным сопротивлением является составляющими полного сопротивления, или импеданса (1), (2):

$$Z = R + jX \quad (1)$$

$$X = X_L - X_C \quad (2)$$

Термин «импеданс» впервые был введен в конце XIX века английским физиком О. Хевисайдом. В общем случае импеданс состоит из двух частей — реальной и мнимой. Реальная часть импеданса — это сопротивление, а мнимая часть составляется из реактивности системы. Таким образом, для тока или напряжения синусоидальной формы величина комплексного сопротивления — это отношение переменного тока к переменному напряжению, в то время как фазовый угол комплексного сопротивления — это сдвиг фазы, на который ток смещен по отношению к напряжению [3].

Значение и фазовый угол комплексного импеданса легко представить с помощью комплексной диаграммы, представляющей значение вектора импеданса как $|Z|$, а его фазовый угол — как θ . Значение импеданса может быть представлено через его реальную (Z_{re}) и мнимую (Z_{im}) компоненты (3):

$$|Z| = \sqrt{Z_{re}^2 + Z_{im}^2} \quad (3)$$

Графически данные импеданса чаще всего представляются с помощью частотных диаграмм, таких как диаграммы Найквиста и Боде (рис. 1). В диаграмме Найквиста реальная компонента импеданса откладывается на оси x , а мнимая — на оси y . При этом каждая точка на графике соответствует импедансу исследуемой системы при определенной приложенной частоте. Для того чтобы соотнести значение конкретной частоты со значением импеданса системы в данной точке, используются диаграммы Боде или фазовые диаграммы.

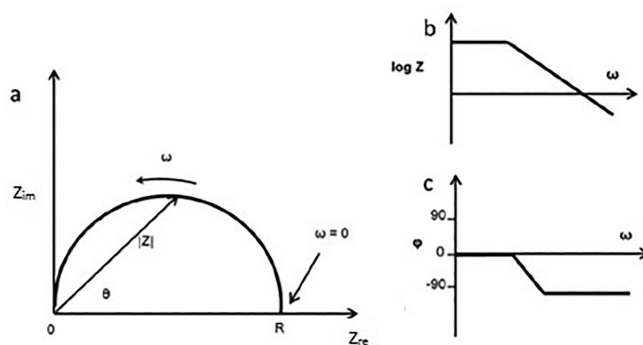


Рис. 1. Диаграммы Найквиста (а), Боде (б) и отношение фазового угла к прикладываемой частоте переменного тока (с)

Данные, получаемые ЭИС, чаще всего обрабатывают с помощью подбора подходящей эквивалентной электрической схемы, в качестве элементов схемы используются стандартные электрические элементы, такие как резисторы, конденсаторы и индуктивности. Эквива-

лентная схема идеального сопротивления будет состоять всего из одного элемента — сопротивления R , при этом импеданс такого элемента будет полностью реальным. Импеданс идеального конденсатора, с другой стороны, будет полностью мнимым, и его схема будет представлять собой одну емкость. Для реальных систем чаще всего эквивалентные электрические схемы состоят из нескольких элементов, соединенных между собой параллельным или последовательным соединением [5]. На рисунке 2 приведена одна из наиболее часто применяемых в ЭИС схем, называемая схемой Рэндлса. Эта схема является базовой для построения многих других схем и состоит из сопротивления электролита (R_s), емкости двойного электрического слоя (C_{dl}) и сопротивления переноса заряда (R_{ct}). Если переводить данную схему на реальные объекты, то она служит эквивалентом простого металлического электрода, опущенного в электролит [22].

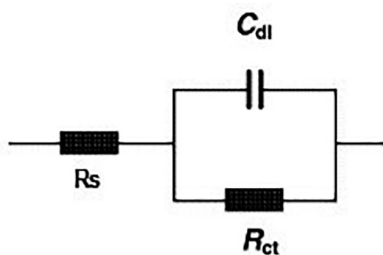


Рис. 2. Эквивалентная электрическая схема Рэндлса. R_s — сопротивление электролита, C_{dl} — емкость двойного электрического слоя, R_{ct} — сопротивление переноса заряда

В зависимости от конкретного случая схему Рэндлса модифицируют, добавляя с помощью параллельного и последовательного соединения новые элементы, и она может быть основой для любых схем, описывающих сложные электрохимические системы [38]. В частности, при наличии в системе диффузионных ограничений в схему дополнительно вводится специальный элемент, называемый элементом Варбурга. Подобная универсальность метода оказывается крайне полезной при изучении биоэлектрохимических систем, так как в ЭИС-биосенсорах это дает возможность получать аналитический сигнал не по изменению одного параметра, а по изменению любого компонента эквивалентной схемы. Под каждый конкретный сенсор можно подобрать от 1 до 3–4 параметров, которые будут изменяться независимо друг от друга при добавлении определяемого вещества, что расширяет границы возможностей использования данного типа биосенсоров. При исследовании БТЭ данная особенность также важна, потому что влияние каждого конкретного

составляющего элемента БТЭ можно оценить по изменению одного конкретного параметра в эквивалентной схеме системы.

Использование ЭИС для создания биосенсоров

Наиболее подходящими системами для изучения с помощью ЭИС являются сложные электрохимические системы, которые содержат как неорганическую часть, так и биоматериал. Биосенсоры относятся к подобным системам, поэтому в последнее время в литературе появилось множество работ, посвященных импедансометрическим сенсорам. Целью разработки биосенсоров в последние годы является создание устройств третьего поколения, основанных на прямом электронном переносе. При этом ЭИС в данный момент рассматривается как один из методов, который может обеспечивать точное определение исследуемых веществ в отсутствие медиатора [11]. ЭИС также используется в качестве дополнительного метода для характеристики различных стадий подготовки электродов в биосенсорах [8, 16], однако в настоящем обзоре мы подробнее остановимся лишь на тех работах, в которых описаны сенсоры, полностью построенные на импедансометрическом сигнале.

Детекция такими биосенсорами основана на изменении импеданса системы, возникающем в ответ на биомолекулярные взаимодействия, происходящие вблизи поверхности электрода. Это позволяет проводить анализ в том числе и без добавления каких-либо дополнительных соединений [7]. Кроме того, использование данных с разных частот дает возможность получать информацию об эффектах диффузии и молекулярных взаимодействиях, происходящих на разном расстоянии от поверхности электрода [17]. В настоящее время импедансная спектроскопия применяется практически во всех типах биосенсоров, включая ДНК-сенсоры, иммуносенсоры, ферментные сенсоры, а также сенсоры на основе целых клеток микроорганизмов.

Имуносенсоры. Особенности использования ЭИС при создании иммуносенсоров подробно описаны в обзоре [33]. В нем отмечено, что импедансометрические иммуносенсоры успешно разработаны и применены на лабораторном уровне, но их коммерциализация затруднена из-за низкой воспроизводимости подобных систем. При этом потенциальная область их применения достаточно широка, и в настоящий момент усилия исследователей направлены на исправление недостатков указанного типа сенсоров. Импедансометрические иммуносенсоры можно разделить на 2 типа, в зависимости

от измеряемого сигнала: фарадеевские и емкостные. Емкостные сенсоры покрыты диэлектрическим слоем, а аналитическим сигналом является емкостный сигнал, возникающий при воздействии переменного тока с низкой частотой. Взаимодействие антигенов и уменьшает измеряемую емкость сенсора. В случае фарадеевского сенсора измеряемым параметром является сопротивление переноса заряда (то есть реальное значение импеданса при частотах ниже 1 Гц), которое увеличивается при взаимодействии антигена с антителом в связи с затруднением переноса электронов. В целом, импедансометрические иммуносенсоры обеспечивают низкие пределы обнаружения, в частности в работе [9] был представлен сенсор для определения атразина, основанный на магнитных наночастицах и обладающий пределом обнаружения в 5 нг/мл. В этом сенсоре магнитные частицы со стрептавидином были иммобилизованы на полипирроловую пленку и функционализированы фрагментом Fab антитела K47. Сейчас проводятся разработки путей амплификации сигнала иммуносенсоров, что может привести к дальнейшему понижению пределов обнаружения.

ДНК-сенсоры. ДНК-биосенсоры на основе импедансной спектроскопии встречаются в литературе на протяжении последних 10 лет [32]. Встраивание нуклеотида в цепочку ДНК при работе ДНК-полимеразы сопровождается выделением иона водорода и пирофосфата, а также увеличением отрицательного заряда растущей ДНК-цепи. В большинстве своем процессы в ячейке импедансометрических ДНК-биосенсоров могут быть описаны эквивалентной схемой Рэндлса, при этом каждый из ее элементов можно использовать для детекции процесса гибридизации ДНК. Импедансометрический сенсор способен детектировать:

- 1) изменение электропроводности раствора при изменении концентрации протонов в системе в процессе гибридизации ДНК;
- 2) изменение процесса переноса зарядов из-за роста отрицательного заряда цепочки ДНК после гибридизации (требуется введение редокс-медиатора);
- 3) изменение емкости системы вследствие увеличения толщины двойного электрического слоя цепочки ДНК после гибридизации.

Работа ДНК-сенсоров основана на взаимодействии между комплементарными цепочками ДНК, одни из которых иммобилизованы на поверхности электрода, а другие находятся в исследуемом растворе. Однако применение импедансной спектроскопии в ДНК-сенсорах не ограничивается детекцией процесса гибридизации. Как показано в работе [43], электрохимическую импеданс-

ную спектроскопию можно использовать для детекции специфического распознавания последовательностей ДНК некоторыми молекулами белков. Авторами изучалось последовательно специфическое расщепление иммобилизованной двойной спирали ДНК (dsДНК) рестриктазой второго типа BamHI. Было выявлено, что во время взаимодействия BamHI с dsДНК происходит расщепление последовательности ДНК, а значение сопротивления электронного переноса на электродах, модифицированных dsДНК, уменьшается с 2994 Ом до 1005 Ом после выдерживания в растворе BamHI в течение 3 часов.

Можно сказать, что область импедансометрических ДНК-биосенсоров в настоящее время активно развивается и данные сенсоры, в отличие от иммуносенсоров, находят применение не только в лабораториях, но и успешно выходят на мировой рынок.

Ферментные биосенсоры. Если разделить все ферментные сенсоры по типу преобразователя на потенциометрические, амперометрические и импедансометрические, то последние в литературе будут встречаться в разы реже. Несмотря на огромное количество описанных сенсоров для определения глюкозы, в литературных данных до сегодняшнего дня подробно описано лишь считанное количество импедансометрических сенсоров на основе глюкозооксидазы [35]. Например, Шервдани и др. в работе [41] предложили количественный метод определения глюкозы с помощью ЭИС. Для этого глюкозооксидазу иммобилизовали на электроде из золота, предварительно модифицированный самоорганизующимися монослоями меркаптановой кислоты, а в качестве измеряемого параметра использовали сопротивление переноса заряда, уменьшавшееся как функция от концентрации глюкозы в системе. При этом авторами был получен предел обнаружения глюкозы в 15,6 мкМ и чувствительность сенсора, составляющая $9,66 \times 10^{-7}$ Ом⁻¹мМ⁻¹.

В нашей работе глюкозооксидазу иммобилизовали на графитовом печатном электроде с помощью геля хитозана (неопубликованные данные). В качестве измеряемого параметра использовали обратное значение от величины сопротивления переноса заряда. Вид диаграмм Найквиста и калибровочной кривой для полученного импедансометрического сенсора на глюкозу представлен на рисунке 3. Линейный диапазон определения глюкозы составил 1–15 мМ.

Во многих работах метод импедансной спектроскопии используется как вспомогательный в процессе создания сенсора для определения влияния каждого

нового компонента на электрохимические свойства сенсорной системы. Сами же биосенсоры при этом остаются потенциометрическими или амперометрическими, в зависимости от типа преобразователя. Тем не менее есть и системы, которые основаны исключительно на измерении импеданса, причем используются такие сенсоры для определения самых разных веществ, включая мочевины [6, 29], пероксид водорода [40], цианиды [4] или спирты [31]. Основной стадией при создании импедансометрических сенсоров является стадия иммобилизации фермента, и от нее сильно зависит общая производительность сенсора. Из-за сложности методов иммобилизации область ферментных импедансометрических сенсоров менее развита, чем область ДНК-сенсоров или иммуносенсоров.

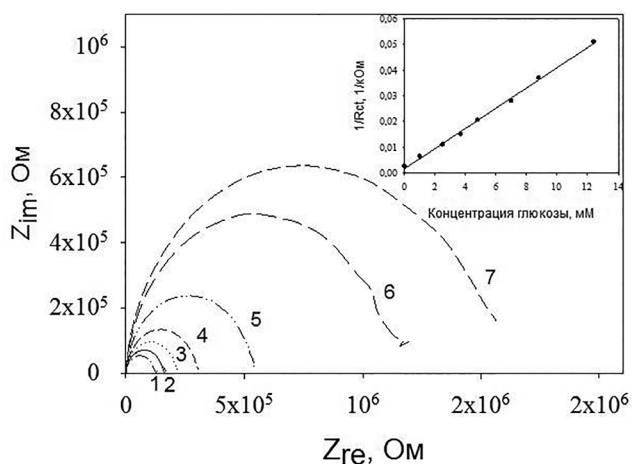


Рис. 3. Диаграммы Найквиста для импедансометрического сенсора на глюкозу. Ось X — реальная компонента импеданса; ось Y — мнимая компонента импеданса. Цифрами обозначены зависимости, соответствующие концентрации глюкозы: 1 — 0 мМ; 2 — 1,2 мМ; 3 — 2,7 мМ; 4 — 5,4 мМ; 5 — 7,2 мМ; 6 — 9,8 мМ; 7 — 12 мМ

Клеточные биосенсоры. В биосенсорах на основе целых клеток для детекции используются либо бактериальные, либо эукариотические клетки. Использование целых клеток для биораспознавания имеет свои преимущества, в первую очередь, хорошую приспособленность подобных систем для детекции *in situ*, а также их доступность.

Бактериальные биосенсоры с импедансометрическими преобразователями можно поделить на два типа, в зависимости от расположения клеток в сенсоре. Первый тип сенсоров измеряет изменения в системе, связанные с взаимодействиями между анализируемой смесью и электродами, модифицированными бактериями. Второй

тип работает на детекции метаболитов, продуцируемых бактериальными клетками в процессе их роста в присутствии анализируемого соединения. К клеточным импедансометрическим биосенсорам следует отнести сенсоры для определения присутствия *E. coli* [20, 30], сульфат-редукторов [34], трихлорэтилена [15] и бактериофагов PhiX174 [10].

В целом, в настоящее время в литературе описаны импедансометрические сенсоры, основанные на иммобилизации ферментов, антител, ДНК и РНК, лектинов, целых клеток и бактерий. Наиболее развитыми областями применения импедансометрических сенсоров остаются область иммуноанализа и область ДНК-сенсоров, в которых подобные сенсоры успешно применяются в последнее десятилетие благодаря своей чувствительности, низкому пределу обнаружения и хорошей воспроизводимости. В дальнейшем данная область будет лишь расширяться за счет использования новых типов биоматериалов в качестве распознающих элементов, что позволит найти более широкое применение и ферментным, и клеточным биосенсорам, а также за счет употребления новых материалов для электродов сенсоров.

Использование ЭИС для изучения характеристик БТЭ

Так как импедансная спектроскопия вот уже много лет применяется при изучении электрических батарей и традиционных топливных элементов [26], исследователи использовали эту технику для изучения параметров биотопливных элементов. Изначально ЭИС применялась для БТЭ точно так же, как и для топливных элементов — для получения значения внутреннего сопротивления элемента (R_{in}) [13]. Однако затем стало понятно, что для характеристики такой сложной системы, как БТЭ, метод импеданса предоставляет намного больше возможностей. До XXI века внутреннее сопротивление БТЭ рассчитывалось по закону Ома или с помощью метода прерывания тока, при этом возможно было высчитать лишь омическое сопротивление элемента. В БТЭ же большой вклад вносят активационные и концентрационные сопротивления, и метод ЭИС позволяет рассчитать вклад каждого конкретного сопротивления в общее внутреннее сопротивление БТЭ.

Ток, связанный с транспортом электронов через поверхность электрода, содержит как фарадеевскую (ток, связанный с электрохимической реакцией), так и нефарадеевскую (ток, не связанный с электрохимической реакцией) составляющие. Фарадеевская составляющая

возникает при преодолении активационного барьера, связанного с поляризационным сопротивлением (R_p) и омическим сопротивлением (R_s). Нефарадеевская составляющая связана с зарядом двойного электрического слоя на границе раздела электрод-электролит, что выражается емкостью двойного электрического слоя (C). Вклад в омическое сопротивление в случае микробных БТЭ вносят сопротивление электролита, протон-проницаемой мембраны и сопротивление проводов. В то время как емкость двойного электрического слоя и омическое сопротивление практически идеальны, фарадеевский компонент (R_p) не является идеальным и меняется с изменением частоты. Поляризационное сопротивление состоит из потерь, связанных с активацией переноса заряда — сопротивления переноса заряда (R_{CT}), и потерь, связанных с лимитирующей диффузией в системе. В большинстве случаев для БТЭ характерно именно кинетическое лимитирование из-за небольших скоростей реакций как на аноде, так и на катоде. Перенос заряда в системе влияет на перенос реагентов и продуктов электрохимической реакции, включая в себя таким образом и диффузионное сопротивление. И R_{CT} и диффузионное сопротивление физически находятся на поверхности между электродом и электролитом.

На внутреннее сопротивление БТЭ могут влиять такие факторы, как использование различных типов субстратов, электронных акцепторов, медиаторов, различная концентрация используемых буферов, конфигурация самой ячейки БТЭ [39]. В последние 10 лет ЭИС используется для изучения каждого из компонентов внутреннего сопротивления БТЭ с помощью эквивалентных электрических схем, при этом схема Рэндлса используется в качестве базовой схемы для описания одного из электродов БТЭ. Стандартная же схема для описания БТЭ состоит из двух схем Рэндлса, последовательно соединенных между собой омическим сопротивлением электролита. Нахождение значения каждого из этих компонентов может помочь в оптимизации конфигураций новых БТЭ и привести к созданию более совершенных и мощных систем.

Одна из первых работ, посвященная использованию ЭИС для изучения микробного биотопливного элемента, была направлена на исследование электрохимических свойств анода [25]. Была найдена зависимость сопротивления переноса анода БТЭ от формирования на нем биопленки бактерий *S. oneidensis* MR-1, которое снижалось с 7790 до 10,2 кОм в процессе их роста. При этом было отмечено, что другие параметры системы, измеряемые методом импеданса,

не изменялись в процессе роста бактерий, что позволило четко связать изменение биоматериала с изменением поляризационного сопротивления анода БТЭ. Подобные уменьшение поляризационного сопротивления и увеличение емкости наблюдались при работе с бактериями *Geobacter sulfurreducens* [42]. В работе [46] исследовано влияние образования биопленки на нескольких типах углеродных анодов, в результате наблюдалось снижение сопротивления переноса заряда при росте биопленки на всех шести исследованных анодах. Часть работ посвящена и влиянию роста бактерий на общую емкость анода или катода, в которых при росте биоматериала на поверхности электрода происходит увеличение его общей емкости от 2 до 5 раз. Все эти исследования подтверждают большое значение свойств биоматериала для производительности БТЭ.

Кроме роста биопленки на поверхности анода, существуют и другие параметры, варьированием которых можно добиться улучшения электрохимических свойств элемента. В частности, в статье [47] было изучено влияние показателя рН на жизнедеятельность микроорганизмов в составе БТЭ и, соответственно, на производительность элемента. Было выявлено, что бактерии, используемые для окисления органического топлива, зачастую предпочитают нейтральный показатель рН, в то время как в катодном отделении для восстанавливающих кислород бактерий предпочтительнее щелочная среда. Работа [14] была посвящена применению импеданса для изучения скорости анодной и катодной реакции при уровнях рН от 5 до 10, и полученные результаты коррелируют с представленными выше. Так, минимальное поляризационное сопротивление анода было получено при рН, равном семи, в то время как сопротивление катода последовательно уменьшалось при смещении рН в сторону щелочных растворов.

Нельзя обойти вниманием и материал, из которого конструируется биоанод. Электроды для БТЭ должны обладать целым рядом свойств: высокой проводимостью, химической стойкостью, биосовместимостью, высокой удельной поверхностью, а также возможностью технологической обработки, включая армирование и введение в них композитных материалов. Метод ЭИС позволяет исследовать процессы, происходящие в анодном отделении, и устанавливать их зависимость от материала, из которого изготовлен биоанод. К примеру, в работе [1] авторами было исследовано влияние углеродных наноматериалов, таких как многостенные углеродные нанотрубки, терморасширенный графит (ТРГ) и высоко ориентированный пиролитический графит (ВОПГ), на биоэлектрохимическую активность

клеток *Gluconobacter oxydans* в составе работающего БТЭ. Для этого определяли сопротивление переноса заряда анодов, модифицированных различными углеродными наноматериалами, и сравнивали их с контрольным анодом из немодифицированного спектрального графита. На рисунке 4 представлены диаграммы Найквиста для таких биоанодов. Полученные данные открыли возможность сделать вывод о преимуществе использования углеродных нанотрубок для модификации анодов БТЭ и о непригодности ВОПГ для применения в подобном формате.

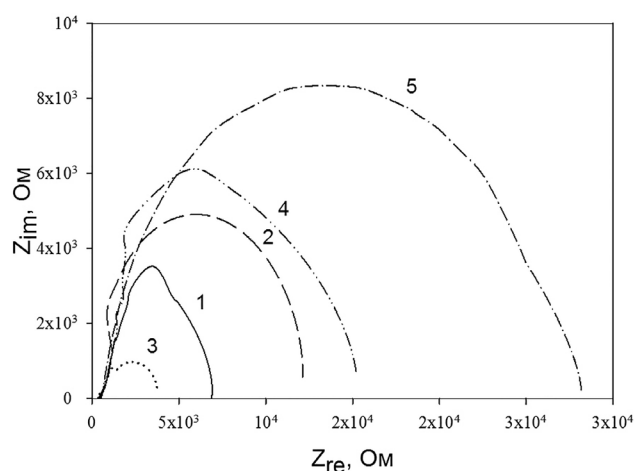


Рис. 4. Диаграммы Найквиста для углеродных электродов. Основа рабочего электрода: 1 — спектральный графитовый электрод; 2 — ТРГ; 3 — спектральный графитовый электрод, модифицированный ФМНТ (функционализированными многостенными нанотрубками); 4 — спектральный графитовый электрод, модифицированный ВОПГ; 5 — ВОПГ. Ось X — реальная компонента импеданса; ось Y — мнимая компонента импеданса [1]

Кроме перечисленных выше, существует еще несколько других факторов, которые нужно принимать во внимание при проектировании БТЭ и в изучении которых может помочь ЭИС. В частности, в работе [36] представлены преимущества применения феррицианида в качестве заместителя кислорода в катодной реакции. Было доказано, что сопротивление переноса заряда катода при использовании феррицианида снижается, что связывалось с большей скоростью реакции восстановления. Помимо этого, исчезали диффузионные ограничения, регистрируемые с помощью ЭИС специальным элементом Варбурга, что также положительно сказывалось на производительности БТЭ. Влияние диффузии кислорода на производительность БТЭ было описано в работах [19, 23], где оно также было охарактеризовано с помощью

специальных эквивалентных схем, включающих в себя элемент Варбурга.

Большое влияние на скорость реакции восстановления в катодном отделении оказывает и материал, из которого сделан катод. В исследовании [27] сравнивались катоды, изготовленные из платины, графита, оксида марганца и оксида железа. Анализ с помощью метода ЭИС установил, что их сопротивления переноса заряда были равны 4,4, 18,1, 3,6 и 4,1 Ом, соответственно. С помощью изучения общего импеданса катода был сделан вывод о преимуществе платиновых катодов над другими.

В работах, посвященных определению импеданса всего БТЭ целиком, можно заметить, что зачастую ключевую роль в общем внутреннем сопротивлении играет омическое сопротивление; поэтому большие усилия должны быть направлены именно на его уменьшение. В частности, в статье [45] было показано, что почти 60% от общего сопротивления элемента составляло омическое сопротивление. В том же исследовании был предложен способ решения проблемы — двукратное увеличение площади сетки БТЭ уменьшило омическое сопротивление с 24 до 14 Ом, что привело к уменьшению общего сопротивления элемента с 41 до 27,5 Ом. Были предложены и шаги для улучшения производительности БТЭ — понижение сопротивления электролита с помощью увеличения молярности буфера или изменение конфигурации реактора для уменьшения расстояния между электродами.

Еще одной составляющей общего сопротивления элемента является сопротивление мембраны, разделяющей анолит и католит. Обычно оно включается в общее омическое сопротивление, но с помощью метода ЭИС можно выделить и отдельное сопротивление мембраны с помощью добавления еще одного сопротивления в эквивалентную схему. В частности, в работе [21] метод ЭИС использовался для характеристики влияния материала протон-проницаемой мембраны на производительность БТЭ. Авторами были выбраны нафионовая, незаряженная поливинилиден флуорид PVDF и сульфонирующая поливинилиден флуорид мембраны. Сульфонирующая PVDF мембрана продемонстрировала наименьшее сопротивление среди всех трех испытанных материалов и в результате была предложена авторами в качестве альтернативы для широко используемой нафионовой мембраны. При этом БТЭ на основе сульфонирующей PVDF мембраны должны обеспечивать лучшую производительность по сравнению со стандартными в связи с меньшим сопротивлением самой мембраны (7,5 Ом против 11,3 Ом у нафионовой мембраны).

Заключение

В представленном обзоре рассмотрены развитие импедансометрических биосенсоров и возможность их применения для решения различных задач. В настоящее время ЭИС употребляется в различных типах биосенсоров, включая иммуносенсоры, ДНК-сенсоры и ферментные сенсоры, причем особенно широко востребованы сенсоры первых двух типов. Однако в основном данные сенсоры существуют на лабораторном уровне, и их выход на мировой рынок ограничен такими аналитическими параметрами, как относительно низкая воспроизводимость. Тем не менее потенциал импедансометрических и ДНК-сенсоров очевиден из-за возможности быстрого и точного определения молекулярных взаимодействий, происходящих у поверхности электрода. Кроме того, нельзя забывать и о потенциале ЭИС в плане изучения электрохимических свойств тканей живых организмов, отдельных клеток и их фрагментов.

Обзор показывает, что из всех биотехнологических применений наибольшую популярность метод ЭИС получил при изучении биотопливных элементов, а всего за последние 10 лет опубликовано более ста работ, так или иначе посвященных изучению импеданса целых БТЭ или отдельных их компонентов. Метод используется как для нахождения общего внутреннего сопротивления элемента, так и для оценки вклада каждого конкретного компонента системы в производительность БТЭ.

Таким образом, актуальным предстоит расширенное и углубленное изучение возможности использования импедансной спектроскопии в сочетании с традиционными методами исследования в области биосенсоров и биотопливных элементов, такими как циклическая вольтамперометрия, сканирующая электронная микроскопия и др. Само по себе нахождение импеданса системы не дает исчерпывающих знаний об ее устройстве, но сочетание метода ЭИС с другими методами способствует наиболее полному пониманию процессов, происходящих в биоэлектрохимических системах.

Литература

1. Решетилов А.Н. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 1. — С. 115–122.
2. Шольц Ф. Электроаналитические методы. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006.
3. Barsoukov E., Macdonald J.R. (Eds.). Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications. — N.Y., Wiley, 2005.

4. Bouyahia N. et al. // Bioelectrochemistry. — 2011. — Vol. 80. — P. 155–161.
5. Chang B.Y., Park S.M. // Annual Rev. Anal. Chemistry (Palo Alto, California). — 2010. — Vol. 3. — P. 207–229.
6. Cortina M. // Sens Actuators B. — 2006. — Vol. 118. — P. 84–89.
7. Daniels J.S. and Pourmand N. // Electroanalysis. — 2007. — Vol. 19. — No. 12. — P. 1239–1257.
8. Deng S. et al. // Biosensors and Bioelectronics. — 2009. — Vol. 25. — P. 373–377.
9. Fredj et al. // Talanta. — 2008. — Vol. 75. — P. 740.
10. García-Aljaro V. et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — Vol. 75. — P. 329–366.
11. Hammond et al. // Essays in Biochemistry. — 2016. — Vol. 60. — P. 69–80.
12. He Z., Mansfield F. // Energy Environ. Sci. — 2009. — Vol. 2. — P. 215–219.
13. He Z. // Environ. Sci. Technol. — 2006. — Vol. 40. — P. 5212–5217.
14. He Z. et al. // Bioelectrochem. — 2008. — Vol. 74. — P. 78–82.
15. Hnaien M. et al. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2011. — Vol. 400(4). — P. 1083–1092.
16. Kang X. et al. // Biosensors and Bioelectronics. — 2009. — Vol. 25. — P. 901–905.
17. Katz E, Willner I. // J. Am. Chem. Soc. — 2003 Jun 4. — Vol. 125(22). — P. 6803–6813.
18. Kelly et al. Electrochemical techniques in corrosion science and engineering (1st ed.). — CRC Press, 2002. — 244 p.
19. Kim J.R. et al. // J. Power Sour. — 2009. — Vol. 187. — P. 393–399.
20. Kim T.H. et al. // Advanced Materials. — 2009. — Vol. 21. — P. 91–94.
21. Kim Y. et al. // J. Membrane Sci. — 2014. — Vol. 463. — P. 205–214.
22. Lasia A. // Kluwer Academic/Plenum Pub. — 1999. — Vol. 32. — Ch. 2. — P. 143.
23. Lepage G. et al. // Bioresour. Technol. — 2012. — Vol. 124. — P. 199–207.
24. Liu et al. // Environ. Sci. Technol. — 2005. — Vol. 39. — P. 5488–5493.
25. Manohar A. et al. // Bioelectrochem. — 2008. — Vol. — 72. — P. 149–154.
26. Mansfeld F. // Electrochim. Acta. — 2007. — Vol. 52. — P. 7670–7680.
27. Martin E. et al. // Electrochimica Acta. — 2011. — Vol. 58. — P. 58–66.
28. Meredith M.T. and Minter S.D. // Annu. Rev. Anal. Chem. — 2012. — Vol. 5. — P. 157–179.
29. Mondal S. and Sangaranarayanan M.V. // Sens Actuators B. — 2013. — Vol. 177. — P. 478–486.

30. Muñoz-Berbel X. *et al.* Impedance-Based Biosensors for Pathogen Detection. – New York: Springer, 2008.
31. Myler S. *et al.* // Biosens. Bioelec. – 2005. – Vol. 21. – P. 666–671.
32. Ozsoz M. Electrochemical DNA biosensors. – Pan Stanford, 2012. – 517 p.
33. Prodromidis M.I. // Electrochimica Acta. – 2010. – Vol. 55. – P. 4227–4233.
34. Qi P. *et al.* // Sens Actuators B. – 2013. – Vol 181. – P. 274–279.
35. Rahman M.M. // Sensors (Basel, Switzerland). – 2010. – Vol. 10(5). – P. 4855–4886.
36. Ramasamy R.P. *et al.* // Biotechnol. Bioeng. – 2009. – Vol. 104. – P. 882–891.
37. Roy *et al.* // RSC Advances. – 2012. – Vol. 2. – P. 10020–10027.
38. Ruiz G.A. // Int. J. Electrochem. Sci. – 2015. – Vol. 10. – P. 8484–8496.
39. Sekar N., Ramasamy R.P. // J. Microb. Biochem. Technol. – 2013. – S6:004.
40. Shamsipur M. *et al.* // Bioelectrochemistry. – 2012. – Vol. 83. – P. 31–37.
41. Shervedani R.K. // Bioelectrochemistry. – 2006. – Vol. 69. – P. 201–208.
42. Srikanth S. *et al.* // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – Vol. 99(5). – P. 1065–1073.
43. Tersch C., Lisdat F. // Electrochimica Acta. – 2011. – Vol. 56. – P. 7673–7679.
44. Turner A.P.F. // Chem. Soc. Rev. – 2013. – Vol. 42. – P. 3184–3196.
45. You S. *et al.* // Biosens. Bioelectron. – 2008. – Vol. 23. – P. 1157–1160.
46. Yuan Y. *et al.* // Environ. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 47(24). – P. 14525–14532.
47. Zhang Y. *et al.* // J. Power Sources. – 2011. – Vol. 196(18). – P. 7458–7464.

THE USE OF IMPEDANCE SPECTROSCOPY TO STUDY THE CHARACTERISTICS OF BIOSENSORS AND BIOFUEL ELEMENTS

S.E. TARASOV, Yu.V. PLEKHANOVA, A.N. RESHETILOV

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

The review presents modern approaches to the electrochemical detection of processes occurring in biosensors and biofuel cells using impedance spectroscopy. Biosensors described in the literature on the basis of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and the possibility of using EIS for studying the characteristics of microbial and enzymatic biofuel elements are considered.

Keywords: impedance, biosensor, electrochemical impedance spectroscopy, biofuel element, bioelectrochemistry.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2017 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1877 — Роберт Кох разработал метод культивирования микроорганизмов в биологических жидкостях, предложил метод окрашивания бактерий анилиновыми красителями.

1882 — открытие фагоцитоза И.И. Мечниковым.

1897 — открытие Эдуардом Бухнером бесклеточного брожения.

1907 — начало изучения дрозофилы Т.Х. Морганом.

1907 — получение Нобелевской премии по химии Э. Бухнером за биохимические исследования и открытие бесклеточного брожения.

1917 — впервые введен термин «биотехнология» (предложен венгерским инженером Карлом Эреки — Karl Ereky, 1865–1933).

1917 — открытие бактериофагии французско-канадским ученым Феликсом Д'Эреллем (Felix Hubert D'Herelle, 1873–1949).

1917 — основание Н.К. Кольцовым Института экспериментальной биологии (Москва) — ныне Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

1922 — Т.Х. Морган создал карту хромосом дрозофилы.

1927 — обнародование Г. Меллером открытия радиационного мутагенеза: публикация статьи «Искусственная трансмутация генов».

1927 — выступление Н.К. Кольцова на III Всероссийском съезде зоологов, анатомов и гистологов с идеей репликации наследственных молекул.

1937 — обнаружение нуклеопротеидной (РНК) природы вируса табачной мозаики английским вирусологом Ф. Боуденом (Frederick Charles Bawden, 1908–1972).

1947 — Барбара Мак-Клинтон сообщила об открытии подвижных генетических элементов у бактерий («транспозонов»).

1947 — вручение половинной Нобелевской премии по физиологии и медицине супругам Карлу Ф. и Герти Т. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; второй половины — Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

1952 — Алфред Херши и Марта Чейз показали генетическую роль ДНК в бактериофагах.

1952 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Селмэну Ваксману за открытие стрептомицина.

1952 — Дж. Ледерберг обнаружил перенос ДНК от одной бактерии к другой, опосредованный вирусом («трандукция»). Ввел термин «плаزمид».

1957 — присуждение Нобелевской премии по химии Александеру Тодду за работы по нуклеотидам и нуклеотидным коферментам.

1957 — Ф. Крик и Дж. Гамов предложили концепцию центральной догмы молекулярной биологии — переноса генетической информации в цепи: ДНК — мРНК — белок.

1957 — публикация А.С. Спирина, А.Н. Белозерского, Н.В. Шугаевой, Н.В. Ванюшина «Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий» в журнале «Биохимия» (Т. 22, С. 744–754) с предсказанием существования иРНК.

1962 — присуждение Нобелевской премии по химии Дж.К. Кендрию вместе с М. Перуцем за исследование структуры глобулярных белков.

1967 — выделение А. Корнбергом биологически активной ДНК (публикация: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, Vol. 58, P. 2321–2328).

1967 — Мери Вейс и Ховард Грин предложили метод гибридизации соматических клеток.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

1967 — создание Института биологии развития АН СССР (ныне РАН), позднее в 1976 году получившего имя его первооснователя Николая Константиновича Кольцова. Это произошло путем реорганизации преобладающих академических учреждений, преемственно берущих начало от Института экспериментальной биологии, основанного в 1917 г.

1972 — П. Берг сконструировал и получил биологически активную гибридную плазмиду путем обработки рестриктазой двух плазмид с последующей их сшивкой ДНК-лигазой. Таким образом была создана 1-я рекомбинантная молекула ДНК.

1972 — Х.Г. Корана и др. синтезировали полно-размерный ген тРНК.

1972 — присуждение Нобелевской премии по химии К. Анфинсену (одна половина) и У.Х. Стайну и С. Муру (другая половина) за исследования рибонуклеазы.

1972 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж. Эдельману и Родни Р. Портеру за установление химического строения антител.

1977 — У. Гилберт и Ф. Сенгер независимо предложили быстрый метод определения последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК (в результате открылась возможность одному исследователю определять до 1000 нуклеотидов в неделю).

1977 — Б. Риттер и Г. Гудман выделили ген инсулина крысы.

1982 — разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК.

1982 — разрешение FDA на выход на рынок генно-инженерного инсулина человека.

1982 — создание биотехнологическим путем первого культурного растения — стойкого к антибиотикам табака. Начало эры трансгенных растений.

1987 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Судзуми Тонегаве за открытие генетических принципов генерации антител.

1987 — первые полевые испытания генетически модифицированных сельскохозяйственных растений (помидор, устойчивый к вирусным заболеваниям).

1997 — первый опыт клонирования млекопитающего из дифференцированной соматической клетки («овечка Долли») — Институт Рослина, Шотландия.

2002 — расшифровка генома мыши.

2002 — объявлено об успешном завершении секвенирования генома риса (полная расшифровка закончена в 2005 г.).

ПЕРСОНАЛИИ

145 лет со дня рождения Н.К. Кольцова, российского биолога.

130 лет со дня рождения Н.И. Вавилова (25 ноября), отечественного генетика и селекционера.

130 лет со дня рождения Эрвина Шредингера, австрийского физика, лауреата Нобелевской премии (1933, совместно с П. Дираком).

115 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Барбары Мак-Клинток (1902–1992), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1983) за открытие подвижных элементов генома (спустя тридцать с лишним лет после этого открытия).

110 лет со дня рождения и 20 лет со дня смерти Александра Тодда (1907–1997), выдающегося английского химика, лауреата Нобелевской премии по химии (1957).

105 лет со дня рождения Джорджа Паладе (1912–2008), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и К. де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

100 лет со дня рождения Кристиана де Дюва, бельгийского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и Дж. Паладе) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

100 лет со дня рождения и 20 лет со дня смерти Джона К. Кендрю (1917–1997), английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М. Перуцком) за исследования структуры глобулярных белков.

100 лет рождения со дня рождения Родни Роберта Портера (1917–1985), английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, совместно с Дж. М. Эдельманом) за открытие химической структуры антител.

95 лет со дня рождения Хара Гобинда Кораны (1922–2011), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Р.У. Холли и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

90 лет со дня рождения Маршалла У. Ниренберга (1927–2010), американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и Р.У. Холли) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

85 лет со дня рождения Уолтера Гилберта, американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии — 1980 г., половинная премия вместе с Ф.

Сенгером за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах; вторая половина была присуждена Полу Бергу за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в особенности, рекомбинантных ДНК.

75 лет со дня рождения Стенли Б. Прузинера, американского невролога и биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1997) за открытие прионов как нового биологического принципа инфекции.

100 лет со дня смерти Эдуарда Бухнера (1860–1917).

50 лет со дня смерти Г. Меллера, выдающегося генетика, лауреата Нобелевской премии (1946).

45 лет со дня смерти А.Н. Белозерского.

30 лет со дня смерти английского биолога Питера Брайана Медавара (1915–1987), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с М. Бернетом) за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

10 лет со дня смерти Артура Корнберга, известного американского молекулярного биолога.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2017 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

20–22 февраля 2017 года в Москве, в Гостином Дворе состоялись IX Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и Международная специализированная выставка «Мир биотехнологии 2017».

Конгресс был организован при содействии Минпромторга России, Минэкономразвития России, ФАНО России, Департамента природопользования и охраны окружающей среды, Департамента науки, промышленной политики и предпринимательства города Москвы.

ПУБЛИКАЦИИ

Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вишняков И.Е. Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века. — СПб.: Наука, 2016. — 333 с.

Аннотация. В монографии рассматриваются молекулярные основы взаимодействия микоплазм (самых малых, способных к росту на искусственных питательных средах прокариот) с клетками человека, животных и растений в природе, в клинике и при культивировании клеток вне организма. Представлены данные по структуре и функциональной организации генетического аппарата 63 видов микоплазм, геномы которых полностью прочтены и аннотированы к началу 2015 г. Представлены новые данные по ультраструктуре, подвижности и делению клеток микоплазм. Обобщены данные по взаимодействию микоплазм с иммунной системой животных и человека: иммунный ответ организма хозяина на инфицирование микоплазмами, реактивность врожденного и адаптивного иммунитета, механизмы развития аутоиммунных процессов. Особое внимание уделено микоплазмам человека в связи с репродуктивной патологией: бесплодие, послеродовой эндометрит, бактериальный вагиноз, хориоамнионит, спонтанный аборт и преждевременные роды; а также с заболеваниями детей, ассоциированными с микоплазменной инфекцией: врожденная и неонатальная пневмония, бронхо-легочная дисплазия, бактериемия и поражения центральной нервной системы. Представлены возможности современной диагностики для обнаружения и идентификации микоплазменных инфекций на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР, РТ-ПЦР) в разных ее модификациях, что обеспечивает высокую

чувствительность выявления ДНК предполагаемого микрорганισμού. Обсуждаются перспективы и методы подавления микоплазменных инфекций. Отдельные главы посвящены микоплазмам растений и микоплазменным контаминациям клеточных культур. Книга рассчитана на биологов широкого профиля, врачей и ветеринаров.

Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. В 3 томах. Том 1. Основы биохимии, строение и катализ. 3-е издание, исправленное. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. — 696 с.

Аннотация. В томе 1 рассмотрены основы биохимии, связь строения биомолекул с их реакционной и каталитической активностью, строение и функции биомембран, механизмы биосигнализации. Книга предназначена для студентов биологических, химических и медицинских вузов, а также научных работников.

Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. В 3 томах. Том 2. Биоэнергетика и метаболизм. 3-е издание, исправленное. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. — 640 с.

Аннотация. В том 2 вошла часть II «Биоэнергетика и метаболизм». Даны общие термодинамические понятия применительно к биологическим системам, классификация химических реакций, происходящих в живых организмах, подробно рассмотрены основные метаболические пути - гликолиз, глюконеогенез, пентозофосфатный путь, цикл лимонной кислоты, катаболизм жирных кислот и аминокислот, окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование, процессы биосинтеза и деградации основных биомолекул, в том числе жиров, а также принципы регуляции метаболизма.

Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. В 3 томах. Том 3. Пути передачи информации. 3-е издание, исправленное. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. — 448 с.

Аннотация. В том 3 вошла часть III «Пути передачи информации», ответы на вопросы, решения задач и предметно-именной указатель по материалу томов 1–3, а также принятые сокращения и словарь терминов. Обсуждаются основная догма молекулярной биологии и ее современное понимание, процессы передачи и хранения генетической информации как у бактерий, так и у эукариот (репликация, транскрипция, трансляция,

репарация и рекомбинация), строение хромосом, механизмы ферментативных процессов, функции различных РНК в клетке, рибозимы, сплайсинг, альтернативный сплайсинг, процессинг. Подробно описан биосинтез белка, его транспортировка к месту использования и дальнейшее разрушение, регуляция экспрессии генов. В каждой главе (как в томах 1 и 2) приведены примеры из медицины, молекулярной биологии и смежных областей, а также интересные задания и вопросы.

Malinowski M.J. Handbook on Biotechnology Law, Business, and Policy: Human Health Products (Coursebook). 1st ed. — West Academic Publishing, 2016. — 274 p.

Резюме. Книга представляет собой справочное пособие для преподавателей юридического профиля, в котором изложены современные знания по коммерциализации исследований в сфере биотехнологии.

Уилсон К., Уолкер Дж. (Ред.). Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. 2-е изд. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 848 с. — Серия «Методы в биологии».

Аннотация. В учебном издании, написанном авторами из Великобритании, изложены основы теоретических концепций биохимии и молекулярной биологии в приложении к современным методам исследований, среди которых культивирование клеток, микроскопия, центрифугирование, иммунохимический анализ, методы биоинформатики и геной инженерии, методы выделения и очистки белков, хроматография, масс-спектрометрия, электрофорез, оптические методы и радиоизотопный анализ. Во 2-м издании перевод был существенно доработан.

Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Карпенко М.Н. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. 2-е изд. — СПб.: Специальная литература, 2014. — 119 с.

Аннотация. В представленном руководстве в краткой форме изложен материал, необходимый для освоения современных методов иммуногистохимии. В книге содержатся необходимые сведения о теоретиче-

ских основах методов и практических приемах, часть из которых разработана и усовершенствована авторами издания. Отличительной особенностью данного руководства является подробное описание современных иммуноцитохимических способов изучения пролиферации клеток и характеристика наиболее часто используемых в научных исследованиях нейрональных и глиальных маркеров.

Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П. и др. Основы микробиологии и иммунологии: учебник. 8-е изд. / Под ред. В.В. Зверева, Е.В. Будановой. — М.: Академия, 2014. — 288 с. — Серия «Среднее профессиональное образование».

Аннотация. Книга состоит из двух частей, в которых рассмотрены общая микробиология и специальная микробиология. Описаны вопросы систематики, морфологии, физиологии, генетики бактерий, вирусов, грибов и простейших. Освещены проблемы экологической микробиологии, геной инженерии и биотехнологии, представлено новое поколение лечебно-профилактических средств и диагностических методов. Изложены вопросы этиологии, эпидемиологии, патогенеза, иммунитета, лабораторной диагностики, специфической терапии и профилактики основных групп инфекционных болезней человека, вызываемых бактериями, вирусами, грибами и простейшими, а также госпитальных (внутрибольничных) инфекций. Первые три издания выходили под названием «Основы микробиологии, вирусологии, иммунологии».

Вентер К. Расшифрованная жизнь. Мой геном, моя жизнь. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 464 с. — Серия «Universum».

Аннотация. Крейг Вентер — один из ведущих ученых нашего времени, внесший огромный вклад в развитие геномики. В феврале 2001 года Вентер опубликовал полностью секвенированный геном человека. Его замечательные мемуары — честный, откровенный рассказ о своей жизни, в которой было и небогатое детство, и война во Вьетнаме, и общение с выдающимися учеными, научившими его любить науку и честно служить ей.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2017 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18–20 апреля 2017 г.)

С 18 по 20 апреля в Москве будет проходить IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017». Организаторы: НП «Национальное научное общество инфекционистов», ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. *Контакты:* E-mail: conf@md2017.ru; info@md2017.ru.

Празднование 100-летия исследования бактериофагов (Париж, 24–26 апреля 2017 г.)

24–26 апреля 2017 года в Париже, в Институте Пастера состоится конференция, посвященная 100-летней годовщине начала исследований бактериофагов Феликсом д'Эреллем. Мероприятие проводится в сотрудничестве с Тбилисским институтом бактериофагов, микробиологии и вирусологии имени Г.Г. Элиавы. В Научный комитет входят Л. Дебарбье, П. Фортерр, М. Крупович, М. Кутателадзе, Д. Прангишвили. Конференция поддерживается Международным обществом микробных вирусов. *Контакты:* Institut Pasteur Congress-Events Dept. / CIS. 28 rue du Dr Roux. 75724 Paris cedex 15 - France, E-mail: bacteriophage100@pasteur.fr.

VI Международная научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология 2017» (Калининград, 22 мая 2017 г.)

22 мая 2017 года в Калининградском государственном техническом университете состоится VI Международная научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология 2017» под эгидой Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Мероприятие будет проводиться в рамках V Международного «Балтийского морского форума». *Контакты:* 236022 г. Калининград, Советский пр., 1, КГТУ; тел. +7-911-464-20-30, +7 (4012) 46-35-69, e-mail: evgeniya.zemljakova@klgtu.ru.

Европейский биотехнологический конгресс 2017 (Дубровник, 25–27 мая 2017 г.)

С 25 по 27 мая 2017 года в городе Дубровник (Хорватия) состоится Европейский биотехнологический конгресс 2017 (European Biotechnology Congress 2017). *Контакты:* E-mail: scientificbtna2017@eurobiotech2017.eu.

Biotech France 2017 – Международная конференция и выставка (Париж, 28–30 июня 2017 г.)

28–30 июня 2017 года в Париже (Франция) будет организована Международная конференция и выставка «Biotech France 2017». *Контакты:* E-mail: kamel.benmadhi@setcor.org.

Международный конгресс по биотехнологии (GBC 2017) (Бостон, 10–13 июля 2017 г.)

10–13 июля 2017 года в Бостоне (США) будет проводиться Международный конгресс по биотехнологии (Global Biotechnology Congress 2017). *Контакты:* E-mail: info@globalbiotechcongress.com.

Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии 2017» (Севастополь, 2–6 октября 2017 г.)

2–6 октября 2017 года в Севастополе будет проходить Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии 2017». Организатор: Севастопольский государственный университет. *Контакты:* E-mail: conf2017@sevbprc.ru.

Юбилейная конференция «Актуальные проблемы биологии развития» (Москва, 4–6 октября 2017 г.)

4–6 октября 2017 года в Москве, в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН состоится юбилейная конференция «Актуальные проблемы биологии развития», посвященная 100-летию института. *Контакты* на сайте ИБР РАН.

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

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

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



Подписано к печати 30.03.17
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. 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