

**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. Коломбет

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Биологическое действие наночастиц металлов в сочетании с синтетическими пептидами на клинические штаммы микроорганизмов.

*В.Б. Бородулин, И.В. Бабушкина, Е.В. Бородулина, Е.В. Бобылева,
О.Э. Лосев, Е.Г. Чеботарева* 5

Особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микрклонального размножения картофеля.

Г.Л. Бурьгин, К.Ю. Каргаполова, Н.В. Евсеева, О.В. Ткаченко 12

Выявление и деконтаминация микопlasма-инфекции в перевиваемых культурах клеток человека.

*И.Ф. Радаева, Н.С. Куцербубова, А.О. Семенцова, К.Э. Трифонова, М.П. Богрянцева,
С.В. Усова, Е.А. Нечаева* 17

Оценка эффективности биоцида Росима GT против микробного поражения арабографических рукописей.

Г.В. Надеева, Г.Д. Латыпова, Г.Ю. Яковлева 23

Использование ферментативных рыбных гидролизатов как основы для получения жидких органических удобрений.

Н.А. Голубь, В.И. Рябушко, Н.В. Караванцева, Л.А. Радченко, Е.В. Ремесло 29

Исследование динамики инвертазной активности при биотрансформации гидролизатов помолы зерна ржи микромицетом *Aspergillus niger*.

А.А. Принцева, Н.Ю. Шарова, Т.В. Выборнова, А.Р. Юшкаускайте 37

Интенсификация продукции секретиремой рибонуклеазы Bsn *Bacillus subtilis* в условиях солевого стресса.

М.А. Харитонова, А.И. Колпаков, Ф.Г. Куприянова-Ашина 42

Снижение глутатионом токсического действия 2,4,6-тринитротолуола в отношении *Bacillus subtilis* SK1.

Г.Ю. Яковлева, Н.В. Калачева, О.Н. Ильинская 47

Изменение состояния минерального обмена костной ткани препаратом Сояфлан при экспериментальном остеопорозе.

Ю.В. Береснева, Ф.А. Ибрагимов, Н.Л. Выпова 54

Обзоры

Лектины: обзор свойств и перспектив использования в биотехнологии.

А.В. Кобелев, А.С. Сироткин 60

Применение программных продуктов для вторичного метаболомного анализа.

А.С. Доброногова, М.Ю. Чердниченко 68

Хроника

События первой половины 2018 года 74

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

The biological effect of metal nanoparticles in combination with synthetic peptides on clinical strains of microorganisms.

V.B. Borodulin, I.V. Babushkina, Ye.V. Borodulina, Ye.V. Bobyleva, O.E. Losev, Ye.G. Chebotareva 5

Peculiarities of plant inoculation with rhizosphere bacteria as a factor increasing the efficacy of potato microclonal propagation.

G.L. Burygin, K.Y. Kargapolova, N.V. Evseeva, O.V. Tkachenko 12

Detection and decontamination of mycoplasma infections in continuous cell cultures of human.

I.F. Radaeva, N.S. Kutserubova, A.O. Sementsova, K.E. Trifonova, S.V. Usova, E.A. Nechaeva, M.P. Bogryantseva..... 17

Estimation of the effectiveness of the Rocima GT biocide as against microbial damage of the Arabic graphic manuscripts.

G.V. Nadeeva, G.D. Latipova, G.Yu. Yakovleva..... 23

Use of fish enzymatic hydrolysates as a basis for liquid organic fertilizers.

N.A. Golub, V.I. Ryabushko, N.V. Karavantseva, L.A. Radchenko, E.V. Remeslo..... 29

Research of the dynamics invertase activity during biotransformation hydrolysates of grinding grain of rye by micromycete *Aspergillus niger*.

A.A. Printseva, N.Yu. Sharova, T.V. Vybornova, A.R. Yushkauskaitė..... 37

Intensification of the production of secretable ribonuclease Bsn from *Bacillus subtilis* under salt stress condition.

M.A. Kharitonova, A.I. Kolpakov, F.G. Kupriyanova-Ashina 42

Glutathione reduction in the toxic effect of 2,4,6-trinitrotoluene on *Bacillus subtilis* SK1.

G.Yu. Yakovleva, N.V. Kalacheva, O.N. Ilinskaya 47

Change in the state of bone mineral tissue metabolism by Soyafan in experimental osteoporosis.

Yu.V. Beresneva, F.A. Ibragimov, N.L. Vypova..... 54

Reviews

Lectins: a review of properties and prospects for use in biotechnology.

A.V. Kobelev, A.S. Sirotkin 60

Application of software products for secondary metabolomic analysis.

A.S. Dobronogova, M.Yu. Cherednichenko 68

The chronicle

Events of the first half-year 2018 74

Rules for authors 78

К читателям

Во втором номере за 2018 год в основном собраны оригинальные статьи по широкому спектру биотехнологии, биохимии, микробиологии и т.д.

Продолжают цикл своих публикаций авторы из Саратова. В.Б. Бородулин с коллегами (Саратовский государственный медицинский университет) оценили биологическое действие наночастиц металлов в сочетании с синтетическими пептидами на клинические штаммы микроорганизмов. Бурьгин Г.Л. и др. (Институт биохимии, физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова) изучили особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микроразмножения картофеля.

Традиционно активны казанские исследователи. Надеева Г.В. с соавторами из Казанского федерального университета провели оценку эффективности биоцида Росима ГТ против микробного поражения арабграфических рукописей (работа крайне необходима для сохранения уникальных книг из университетской библиотеки). Харитонов М.А. и др. (КФУ) показали, что солевой стресс может активизировать продукцию секретируемых РНКаз (объект изучения — *Bacillus subtilis*). Яковлева Г.Ю., Калачева Н.В., Ильинская О.Н. из того же учреждения исследовали токсическое действие 2,4,6-тринитротолуола в отношении штамма *B. subtilis* SK1. Кобелевым А.В. и Сироткиным А.С. из Казанского национального исследовательского технологического университета представлен обзор о свойствах лектинов и их практическом применении в биотехнологии.

Остальные работы характеризуются широкой географией. Так, группа ученых (Радаева И.Ф. и др.) из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская обл., р.п. Кольцово) изучила актуальный вопрос микоплазма-контаминации перевиваемых культур клеток человека. Голубь Н.А. с сотрудниками из научно-исследовательских институтов Крыма (Севастополь, Симферополь) рассмотрели перспективность использования ферментативных рыбных гидролизатов как основу для получения жидких органических удобрений. Принцева А.А. с коллегами из Санкт-Петербурга (Всероссийский НИИ пищевых добавок) осуществили исследование динамики инвертазной активности при биотрансформации гидролизатов помолы зерна ржи микромицетом *Aspergillus niger*. Береснева Ю.В. и др. (Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, Республика Узбекистан) наблюдали изменения состояния минерального обмена костной ткани под влиянием препарата Сояфлан при экспериментальном остеопорозе.

Наконец, в обзоре Доброноговой А.С., Чередниченко М.Ю. (Тимирязевская академия) рассмотрена проблема применения программных продуктов для вторичного метаболомного анализа.

В разделе «Хроника» помещен некролог памяти Ю.Н. Вавилова, сына Николая Ивановича Вавилова, который много лет активно сотрудничал с нашим журналом и Обществом биотехнологов России, привлекая внимание к генетическим работам своего отца.

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

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ В СОЧЕТАНИИ С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

В.Б. БОРОДУЛИН¹, И.В. БАБУШКИНА^{2*}, Е.В. БОРОДУЛИНА¹,
Е.В. БОБЫЛЕВА¹, О.Э. ЛОСЕВ¹, Е.Г. ЧЕБОТАРЕВА¹

¹ ФБГОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского» Минздрава России,

² НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФБГОУ ВО «Саратовский государственный
медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов

Исучена биологическая активность синтетических пептидов — аналогов индолицидина в сочетании с наночастицами меди и никеля в отношении 40 клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенных от пациентов травматолого-ортопедического стационара с гнойно-воспалительными осложнениями. Наиболее выраженным антибактериальным эффектом обладали индолицидин и пуриноиндолин А на штаммы золотистого стафилококка. На штаммы *E. coli* все изученные пептиды не оказали статистически достоверного антибактериального действия. Проведено исследование комплексного воздействия индолицидина и пуриноиндолина А в сочетании с наночастицами меди и никеля на клинические штаммы стафилококка, которое выявило антибактериальную активность с аддитивной направленностью, достоверно превышающую изолированный антибактериальный эффект наночастиц меди и никеля.

Ключевые слова: пептиды, индолицин, наночастицы, медь, никель, *St. aureus*, *E. coli*.

Введение

Активное формирование антибиотикорезистентности микроорганизмов определяет актуальность разработки и изучения новых, альтернативных антимикробных препаратов. Наночастицы металлов являются перспективными претендентами на создание нового класса антибактериальных средств, поскольку они обладают выраженным противомикробным и антимикотическим эффектом, пролонгированным действием; в биотических дозах стимулируют функциональную активность ферментных систем [1, 2].

Наночастицы меди при введении в организм стимулируют механизмы регуляции микроэлементного состава и активность антиоксидантных ферментов. Медь является необходимой составной частью ряда ферментов, таких как: формиатдегидратаза, глицинредуктаза,

глутатионпероксидаза. Известно, что медь участвует в формировании некоторых белков, в частности белка, участвующего в переносе электрона между флавопротеидами и системой цитохромов [2, 4].

Наночастицы никеля обладают электропроводными и магнитными характеристиками, а также способностью удерживать гистидинилированные белки, принимающие участие в рекомбинации нуклеиновых кислот. Показана способность агрегатов наночастиц никеля ассоциироваться с фрагментами одонитевых ДНК (ssДНК) с образованием стабильных комплексов. Антибактериальное действие наночастиц никеля изучено недостаточно. Имеются единичные публикации о влиянии данного металла на отдельных представителей микрофлоры, установлена способность наночастиц цинка оказывать бактерицидное действие в отношении стандартных штаммов *E. coli* [2, 7].

В настоящее время ведутся поиск и разработка молекул-биосенсоров и биодеструкторов на основе низкомолекулярных лигандов, способных взаимодействовать с активным центром фермента или со специфическими участками рецепторов, расположенных на клеточных мембранах, для активизации информационных сигнальных систем клетки и изменения в целом клеточного метаболизма [3].

© 2018 г. Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.

* Автор для переписки:

Бабушкина Ирина Владимировна

к.м.н., старший научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований НИИТОН ФБГОУ ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России

E-mail: 10051968@mail.ru

При лечении гнойно-воспалительных процессов проникновение нанопрепаратов различной структуры и размеров в бактериальные клетки может быть затруднено из-за особенностей строения бактериальной стенки и отсутствия в ней микропор, из-за механизмов, участвующих в удалении ксенобиотиков из живых клеток, что приводит, в свою очередь, к необходимости увеличивать концентрацию используемого препарата. В то же время синтетические пептиды на основе индолицидина, которые способны нарушать целостность бактериальной клетки, могут «рассматриваться» бактериальной клеткой как питательный субстрат и не распознаваться как ксенобиотик, что, в свою очередь, может быть целенаправленно использовано для подавления биологических функций бактерии с помощью синтетических пептидов [2, 3, 5].

Следует отметить, что подобные технологии и подходы могут быть применены как для лечения заболеваний, так и для создания молекулярных систем нового класса для решения задач практического характера.

В связи с этим в работе исследовали биологическую активность синтетических пептидов — аналогов индолицидина — в отношении клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в сочетании с наночастицами меди и никеля.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на 40 клинических штаммах *S. aureus* (20 штаммов) и *E. coli*. (20 штаммов), выделенных от пациентов с гнойно-воспалительными осложнениями, находящихся на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре.

В работе использовали наночастицы переходной группы металлов: никеля и меди (ТУ 1733-056-00209013-2008), синтезированные на плазмохимическом комплексе Саратовского филиала ФГУП РФ «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (ФГУП РФ ГНЦ ГНИИХТЭОС г. Москва). Наночастицы получали из крупноразмерных образцов металлов с помощью плазменной технологии, основанной на испарении сырья до ультрадисперсных частиц требуемого размера в плазменном потоке с температурой 5000–6000 °К и конденсации пара.

В настоящей работе использовали пептиды индолицидин (пептид 1), ЗВЗ (пептид 2), GSP-1a (пептид 3), пуриноиндоллин А (пептид 4) и тритриптицин (пептид 5). Исследуемые пептиды предоставлены коллегами из ФГУП «Государственный научно-исследовательский

институт особо чистых биопрепаратов». Пептиды представлены следующим набором аминокислот:

№ 1 — (ILPWKWPWWPWRNH₂),

№ 2 — (PITWPWKWWKGGNH₂),

№ 3 — (PLSWFFPRTWGKRNH₂),

№ 4 — (FPVTWRWWKWWKGNH₂),

№ 5 — (VRRFPWWPFLRRNH₂).

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью анализатора микробиологического BBL Crystal Autoreader MD1K040, микроскопа лабораторного Микрос МС-300. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Бактерии обладали резистентностью к пяти и более профильным антибиотикам: бета-лактамам (цефалоспорины 1–2 поколения, оксациллин, метициллин), макролидам (эритромицин), фторхинолонам (ципрофлоксацин, левофлоксацин), аминогликозидам (гентамицин) и ванкомицину.

Взвесь микроорганизмов приготовлена из точной агаровой культуры в изотоническом растворе NaCl, показатель оптической плотности определяли с использованием Densi-La-Meter — 0,5 по стандарту МакФарланда. С каждым штаммом микроорганизмов проведено 5 серий экспериментов с взвесями наночастиц и 0,9% раствором хлорида натрия, используемым для приготовления взвесей:

1-я серия — с 0,9% раствором хлорида натрия в качестве контроля (рН 7,2–7,4);

2-я серия — со взвесью наночастиц меди в концентрации 0,001 мг/мл в 0,9% растворе хлорида натрия;

3-я серия — со взвесью наночастиц никеля в концентрации 0,001 мг/мл в 0,9% растворе хлорида натрия;

4-я серия — со взвесью наночастиц меди в концентрации 0,001 мг/мл и никеля в концентрации 0,001 мг/мл (совместно) в 0,9% растворе хлорида натрия;

5-я серия — со взвесью наночастиц меди в концентрации 0,001 мг/мл в сочетании с пептидом № 1 в конечной концентрации 20 мкг (в эксперимент брали 20 мкл из исходной концентрации пептида, равной 1 мг/мл) в 0,9% растворе хлорида натрия.

С каждым штаммом микроорганизмов проведено 3 серии экспериментов с взвесями наночастиц, пептидами и 0,9% раствором хлорида натрия:

6-я серия — со взвесью наночастиц меди в концентрации 0,001 мг/мл в сочетании с пептидом № 4 в конечной концентрации 20 мкг (в эксперимент брали 20

мкл из исходной концентрации пептида, равной 1 мг/мл) в 0,9% растворе хлорида натрия;

7-я серия — со взвесью наночастиц никеля в концентрации 0,001 мг/мл в сочетании с пептидом № 1 в конечной концентрации 20 мкг (в эксперимент брали 20 мкл из исходной концентрации пептида, равной 1 мг/мл) в 0,9% растворе хлорида натрия;

8-я серия — со взвесью наночастиц никеля в концентрации 0,001 мг/мл в сочетании с пептидом № 4 в конечной концентрации 20 мкг (в эксперимент брали 20 мкл из исходной концентрации пептида, равной 1 мг/мл) в 0,9% растворе хлорида натрия.

Изучение антибактериальной активности наночастиц металлов проводили в соответствии с МУК 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза». Для получения исходного вещества на лабораторных прецизионных весах EG 2200-2NM (KERN, Германия) готовили навески, соответствующие 10 и 5 мг наночастиц металлов, и суспензировали в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Затем проводили последовательное разведение полученной суспензии наночастиц металлов. В работу брали последнее разведение с концентрацией наночастиц 0,001 мг/мл.

Полученную взвесь инкубировали 30, 60, 90 и 120 минут в термошейкере SkyLine ST-3 (ELMI, Латвия) при температуре 37 °С и встряхивании 100 об/мин, после чего по 100 мкл каждого образца высевали на чашки Петри с питательной средой Agar nutrient

(Becton Dickinson, США) и помещали в термостат при 37 °С на 24 часа. На следующий день проводили подсчет выросших колоний.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0 (Реброва О.Ю., 2006). Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Колмогорова — Смирнова, коэффициентов асимметрии и эксцесса. Оценку различий между выборками проводили с использованием t-критерия Стьюдента, так как переменные соответствовали нормальному распределению. В анализе использованы следующие статистические показатели: n — число наблюдений; M — среднее арифметическое значение; m — среднеквадратическая ошибка; p — коэффициент достоверности. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Результаты

Изучалось антибактериальное действие пептидов на клетки *St. aureus* и *E. coli* с предварительной инкубацией клеток и пептидов в 0,9% изотоническом растворе NaCl в течение 30 мин. Время инкубации варьировало от 30 до 120 мин в 0,9% изотоническом растворе NaCl с последующим посевом клеток на твердый питательный агар. Результаты исследования антибактериального действия пептидов на штаммы *St. aureus* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Антибактериальное действие пептидов на штаммы *St. aureus*

Время инкубации	Количество колоний микроорганизмов, КОЕ, $M \pm m$, $n=20$					
	Контроль	Пептид 1	Пептид 2	Пептид 3	Пептид 4	Пептид 5
30 мин	678,3±34,2	339,7±28,0 $p < 0,05$	584,1±38,2 $p < 0,05$	718,5±41,9 $p > 0,05$	421,2±30,7 $p < 0,05$	389,3±27,5 $p < 0,05$
60 мин	693,2±44,5	48,0±12,7 $p < 0,05$	612,4±33,1 $p < 0,05$	697,8±49,9 $p > 0,05$	448,4±32,3 $p < 0,05$	519,0±31,3 $p < 0,05$
90 мин	514,7±31,3	7,5±2,0 $p < 0,05$	593,4±37,1 $p < 0,05$	734,9±57,6 $p < 0,05$	319,0±28,4 $p < 0,05$	635,4±49,9 $p < 0,05$
120 мин	491,4±28,0	2,1±1,3 $p > 0,05$	489,5±45,0 $p > 0,05$	619,4±51,8 $p < 0,05$	216,7±34,4 $p < 0,05$	711,7±59,5 $p < 0,05$

Примечание: p — уровень достоверности различий показателей опытных групп по отношению к группам сравнения

Обнаружено снижение количества выросших колоний на 50% при инкубации клеток *St. aureus* с пептидом № 1, на 43% — при инкубации с пептидом № 5, на 38% — при инкубации с пептидом № 4, на 14% — при инкубации с пептидом № 2. Пептид № 3 не обнаруживал биологической активности при инкубации с клетками в течение 30 мин. Обнаружена различная динамика подавления роста клеток *St. aureus* в присутствии пептидов при различных временных интервалах инкубации клеток с пептидами № 1–5.

Экспериментально доказано, что инкубация пептидов с клетками *E. coli* не приводила к достоверному изменению количества клеток на плотной питательной среде при всех сроках инкубации; данные представлены в таблице 2.

Таким образом, наибольшей антибактериальной активностью в отношении штаммов *St. aureus* обладали пептиды № 1 и № 4. В то же время все изученные

пептиды не проявляли достоверного антибактериального действия на штаммы *E. coli*.

Исследовано сочетанное действие наночастиц металлов и пептидов. По результатам изучения влияния пептидов на клинические штаммы *St. aureus* и *E. coli* для исследования выбраны пептиды с наиболее выраженным антибактериальным эффектом (индолицидин — пептид № 1 и пуриноидин А (пептид № 4). Изучение проводилось на клинических штаммах *St. aureus*, так как на штаммы *E. coli* все изученные пептиды не оказали статистически достоверного антибактериального действия.

Проводилась предварительная инкубация бактериальной взвеси *St. aureus* с растворами пептидов в течение 15 мин с последующим добавлением взвеси наночастиц в 0,9% изотоническом растворе NaCl и инкубацией в течение 30–120 мин. Результаты исследования антибактериального влияния наночастиц меди в сочетании с пептидами на клинические штаммы *S. aureus* представлены в таблице 3.

Таблица 2

Антибактериальное действие пептидов на клетки *E. coli*

Количество колоний микроорганизмов, КОЕ, М±m при инкубации 30–120 мин, n=20					
Контроль	Пептиды				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
713,1±46,4	724,7±63,6 ρ>0,05	698,0±48,5 ρ>0,05	701,5±61,4 ρ>0,05	677,9±59,1 ρ>0,05	659,5±44,7 ρ<0,05

Примечание: ρ — уровень достоверности различий показателей опытных групп по отношению к группам сравнения

Таблица 3

Антибактериальное действие пептидов на штаммы *St. aureus* в сочетании с наночастицами меди

Время инкубации, мин	Количество колоний микроорганизмов <i>St. aureus</i> , КОЕ, М±m, n=20			
	Контроль	Наночастицы меди (опытная группа 1)	Наночастицы меди + пептид № 1 (опытная группа 2)	Наночастицы меди + пептид № 4 (опытная группа 3)
30	1728,5±89,9	624,8±28,4 ρ* < 0,01	15,8±3,8 ρ* < 0,001 ρ** < 0,001	148,9±12,5 ρ* < 0,001 ρ** < 0,001
60	1848,7±123,3	416,5±31,5 ρ* < 0,01	60,3±8,6 ρ* < 0,001 ρ** < 0,001	186,0±17,9 ρ* < 0,001 ρ** < 0,001
120	1924,4±234,5	0,0±0,0 ρ* < 0,01	10,3±3,1 ρ* < 0,001 ρ** < 0,001	64,5±5,2 ρ* < 0,001 ρ** < 0,001

Примечание: ρ* — уровень достоверности различий показателей опытных групп 2 и 3 по отношению к контрольной группе; ρ** — уровень достоверности различий показателей опытных групп 2 и 3 по отношению к опытной группе 1

Обнаружено достоверное ($p < 0,001$) уменьшение количества бактериальных клеток при сочетанном воздействии наночастиц меди и пептидов № 1 и № 4 при всех сроках инкубации. Также антибактериальное действие комплекса наночастиц меди и пептидов достоверно ($p < 0,01$) превышало эффект от изолированного воздействия суспензии наночастиц меди.

Зависимость антимикробного действия пептидов в сочетании с наночастицами меди от времени инкубации на клинические штаммы золотистого стафилококка представлена на рисунке 1. Изучено также антибактериальное действие наночастиц никеля в сочетании с

синтетическими пептидами, результаты представлены в таблице 4.

В отношении штаммов *S. aureus* изолированно наночастицы никеля проявляют антибактериальный эффект при инкубации 120 минут и более. Антимикробная активность сочетанного воздействия наночастиц никеля и пептидов № 1 и № 4 достоверно ($p < 0,001$) превышала антибактериальный эффект наночастиц никеля, была выражена при всех сроках инкубации. Зависимость от времени инкубации антимикробного действия синтетических пептидов в сочетании с наночастицами никеля представлена на рисунке 2.

Таблица 4

Антибактериальное действие синтетических пептидов и наночастиц никеля на штаммы *St. aureus*

Время возд., мин	Количество колоний микроорганизмов <i>St. aureus</i> , КОЕ, $M \pm m$, $n=20$			
	Контроль	Наночастицы никеля (группа 1)	Наночастицы никеля + пептид № 1 (группа 2)	Наночастицы никеля + пептид № 4 (группа 3)
30	1728,7±125,4	1136,0±109,5 $p > 0,05$	51,9±3,8 $p^* < 0,001$ $p^{**} < 0,001$	384,5±10,5 $p^* < 0,001$ $p^{**} < 0,001$
60	1848,3±95,8	1312,1±89,7 $p > 0,05$	0,0±0,0 $p^* < 0,001$ $p^{**} < 0,001$	568,4±12,7 $p^* < 0,001$ $p^{**} < 0,001$
120	1924,2±143,4	656,6±35,5 $p < 0,05$	2,7±1,3 $p^* < 0,001$ $p^{**} < 0,001$	52,1±8,4 $p^* < 0,001$ $p^{**} < 0,001$

Примечание: p^* – уровень достоверности различий показателей опытных групп 2 и 3 по отношению к контрольной группе; p^{**} – уровень достоверности различий показателей опытных групп 2 и 3 по отношению к опытной группе 1

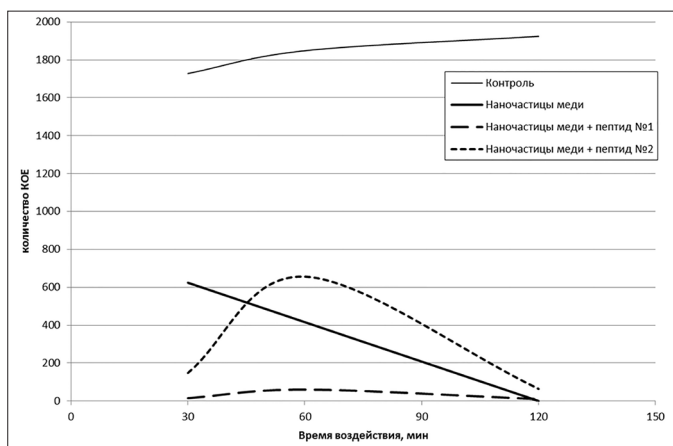


Рис. 1. Антибактериальное действие пептидов в сочетании с наночастицами меди на штаммы *St. aureus*

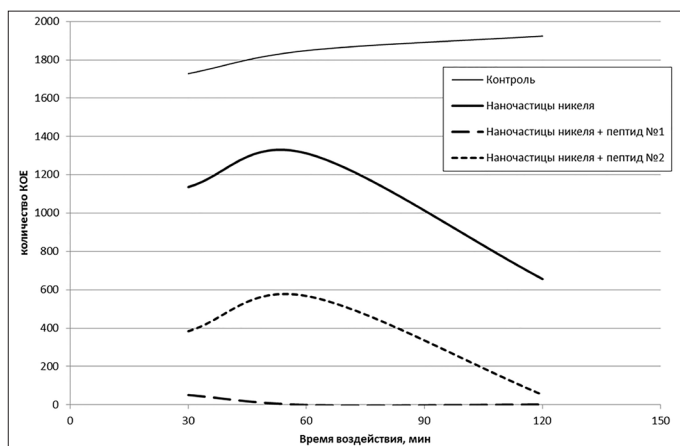


Рис. 2. Антибактериальное действие пептидов в сочетании с наночастицами никеля на штаммы *St. aureus*

Обсуждение

В работе изучено антибактериальное действие синтетических пептидов, а также наночастиц меди и никеля на клинические штаммы *E. coli* и *St. aureus*. Наиболее выраженным антибактериальным эффектом обладали индолицидин (пептид № 1) и пуриноиндолин А (пептид № 4) в отношении штаммов стафилококка. Различие в антибактериальной активности пептидов может быть связано со структурными особенностями строения их молекул, способностью образовывать «сэндвич»-структуры, изменяя конформацию своей молекулы [5, 6]. На штаммы *E. coli* все изученные пептиды не оказали статистически достоверного антибактериального действия.

Обнаруженное различие в антибактериальной активности пептидов на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы может объясняться особенностями строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в том числе *E. coli*. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий обуславливает неэффективность большинства антимикробных агентов, поскольку является непроницаемой для многих химических соединений. Единственным местом проникновения служат пориновые каналы внешней мембраны, которые являются основным путем транспорта питательных веществ внутрь бактериальной клетки. Количество и тип порина могут изменяться с изменением условий окружающей среды, таким образом бактериальная клетка регулирует проницаемость наружной мембраны в ответ на внешний стимул. Через пориновые каналы могут проникнуть соединения с низкой молекулярной массой и определенной пространственной структурой [2, 7].

При сравнении активности наночастиц выявлена достоверно более высокая активность наночастиц меди по сравнению с наночастицами никеля в отношении клинических штаммов стафилококка, что подтверждается другими исследованиями [2, 7]. Также проведено исследование комплексного воздействия индолицидина и пуриноиндолина А в сочетании с наночастицами меди и никеля на клинические штаммы стафилококка. Изучение совместного действия пептидов и наночастиц выявило антибактериальную активность с аддитивной направленностью, достоверно превышающую изолированный антибактериальный эффект наночастиц меди и никеля.

Данные, полученные в результате исследования, доказывают, что синтетические пептиды на основе индолицидина способны потенцировать антибактериальное действие наночастиц металлов. Это связано со способностью синтетических пептидов на основе индолицидина нарушать

целостность клеточной стенки бактериальной клетки [3, 8]. Они могут «рассматриваться» бактериальной клеткой как питательный субстрат и не распознаваться как ксенобиотик, что может быть целенаправленно использовано для подавления биологических функций бактерий с помощью синтетических пептидов [8, 9]. Синтетические пептиды облегчают проникновение нанолекарств различной структуры и размеров в бактериальные клетки, которое может быть затруднено из-за особенностей строения бактериальной стенки и отсутствия в ней микропор, из-за механизмов, участвующих в удалении ксенобиотиков из живых клеток, что приводит, в свою очередь, к необходимости увеличивать концентрацию используемого препарата. Сочетанное применение синтетических пептидов и наночастиц металлов позволяет использовать нанолекарства в меньших концентрациях и избегать возникновения токсических и кумуляционных эффектов.

Заключение

Поиск и исследование биологических свойств наночастиц в сочетании с низкомолекулярными пептидами в виде соединений направленного антибактериального действия являются одним из перспективных путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов и внедрения подобных соединений в клиническую практику.

Литература

1. Викторов Д.В., Пивень Н.Н. Активный мембранный транспорт и множественная антибиотикорезистентность бактерий // Мол. генетика, микробиология и вирусология. — 2001. — № 3. — С. 3–7.
2. Мамонова И.А. Влияние наночастиц переходной группы металлов на антибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Москва, 2013. — 24 с.
3. Шамова О.В. Молекулярно-клеточные основы реализации биологической активности антимикробных пептидов лейкоцитов: автореферат дис. докт. биол. наук. — Санкт-Петербург, 2013. — 46 с.
4. Ahamed M., Siddiqui M.A., Akhtar M.J. et al. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2010. — Vol. 396(2). — P. 578–583.
5. Alfred R.L., Palombo E.A., Panozzo J.F. et al. Stability of puoroindoline peptides and effects on wheat rust // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2013. — Vol. 29(8). — P. 1409–1419.

6. Alfred R.L., Palombo E.A., Panozzo J.F. et al. The antimicrobial domains of wheat puroindolines are cell-penetrating peptides with possible intracellular mechanisms of action // PLoS One. — 2013. — Vol. 8(10). — e75488.
7. Azam A., Ahmed A.S., Oves M. et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study // Int J. Nanomedicine. — 2012. — Vol. 7. — P. 6003–6009.
8. Chan D.I., Prenner E.J., Vogel H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action // Biochim. Biophys. Acta. — 2006. — Vol. 1758(9). — P. 1184–1202.
9. Chou H.T., Wen H.W., Kuo T.Y. et al. Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity // Peptides. — 2010. — Vol. 31(10). — P. 1811–1820.

THE BIOLOGICAL EFFECT OF METAL NANOPARTICLES IN COMBINATION WITH SYNTHETIC PEPTIDES ON CLINICAL STRAINS OF MICROORGANISMS

V.B. BORODULIN¹, I.V. BABUSHKINA², Ye.V. BORODULINA¹,
Ye.V. BOBYLEVA¹, O.E. LOSEV¹, Ye.G. CHEBOTAREVA¹

¹ V.I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of Russia,

² Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of V.I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saratov

Biological activity of synthetic peptides analogues of indolicidin in combination with copper and nickel nanoparticles was studied for 40 clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from traumatologic and orthopedic patients with pyoinflammatory complications. The most pronounced antibacterial effect was indolicidin and puroindolin A on strains of *Staphylococcus aureus*. All studied peptides did not have statistically significant antibacterial effects on *E. coli* strains. The complex effect of indolicidin and puroindolin A in combination with copper and nickel nanoparticles on clinical strains of staphylococcus was investigated, which revealed antibacterial activity with an additive directionality significantly higher than the isolated antibacterial effect of copper and nickel nanoparticles.

Keywords: synthetic peptides, indolicidin, nanoparticles, nickel, copper, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

ОСОБЕННОСТИ ИНОКУЛЯЦИИ РАСТЕНИЙ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ

Г.Л. БУРЫГИН^{1,2*}, К.Ю. КАРГАПОЛОВА², Н.В. ЕВСЕЕВА¹, О.В. ТКАЧЕНКО²

¹ФГБУН «Институт биохимии физиологии растений и микроорганизмов РАН»,

²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», Саратов

Микроклональное размножение растений *in vitro* основной способ получения оздоровленного посадочного материала сельскохозяйственных и декоративных культур. Одним из методов повышения адаптационного потенциала микрорастений к нестерильным условиям почвы является бактеризация после стадии культивирования *in vitro*. В данной работе на примере двух ризосферных штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 с различающимися биохимическими свойствами были исследованы ростстимулирующие эффекты на микроклоны картофеля при бактеризации в различные сроки культивирования *in vitro*. Выявлено, что инокуляция штаммом *Azospirillum brasilense* Sp7, неспособным к росту на среде Мурасиге — Скуга, наиболее эффективна на стадии черенкования микрорастений. В то же время бактеризация микрорастений картофеля штаммом *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 оптимальна в середине стадии культивирования *in vitro*.

Ключевые слова: картофель, микроклональное размножение, ростстимулирующие ризобактерии, *in vitro*.

Введение

Микроклональное размножение растений *in vitro* — основной способ получения оздоровленного посадочного материала вегетативно размножаемых сельскохозяйственных и декоративных культур. Условия культивирования микрорастений *in vitro* оказывают специфическое воздействие на строение и функцию тканей и органов. В связи с этим процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям сопряжен с существенными трудностями, поскольку защитные системы стерильных растений выражены слабо и приспособление их к условиям почвы часто проходит болезненно, с высоким процентом гибели регенерантов (Деменко, Лебедев, 2011) [3]. Одним из способов повышения адаптационного потенциала микрорастений к нестерильным условиям почвы является бактеризация после стадии культивирования *in vitro* (Vettori et al., 2010 [10]; Lareen et al. 2016 [8]). Однако коммерческие

бактериальные препараты, активно применяемые в агробиотехнологии для повышения урожайности многих сельскохозяйственных культур (Bashan et al., 2014) [5], при микроклональном размножении растений на этапе культивирования *in vitro* практически не используются.

Нами ранее было показано, что инокуляция ризобактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 микроклонов четырех сортов картофеля (Tkachenko et al., 2015) [9] и смолевки меловой (Крицкая с соавт., 2017) [4] в начале стадии *in vitro* оказывала положительный эффект на развитие растений и их приживаемость к нестерильному грунту. Также был охарактеризован бактериальный штамм *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 (Бурьгин с соавт., 2017) [1] в качестве природного симбионта картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский в каштановых почвах Саратовской области.

Целью данной работы был подбор оптимальных условий инокуляции микрорастений картофеля *in vitro* ризосферными ростстимулирующими бактериями *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, позволяющих более полно реализовать ростстимулирующий потенциал ризобактерий.

Материалы и методы

Микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский, использованные в работе, были получены из пересадочной *in vitro*-коллекции кафедры

© 2018 г. Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Евсеева Н.В., Ткаченко О.В.

* Автор для переписки:

Бурьгин Геннадий Леонидович

кандидат биол. наук,

ст.н.с. ФГБУН «Институт биохимии физиологии растений и микроорганизмов РАН»; доцент ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

E-mail: burygingl@gmail.com

растениеводства, селекции и генетики агрономического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет». Микрорастения культивировали на питательной среде Мурасиге – Скуга без гормонов с добавлением агар-агара 7 г/л и сахарозы 30 г/л в условиях 16-часового фотопериода при температуре 24 °С.

В работе были использованы следующие бактериальные штаммы: *Azospirillum brasilense* Sp7 (IBPRM 150, VKMB-1547, ATCC 29145), *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 (RCAM04481, IBPRM 544). Культуры выращивали на жидкой малатно-солевой среде следующего состава (г/л): яблочная кислота – 3,8, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 0,4, KH_2PO_4 – 0,4, $MgSO_4 \times 6H_2O$ – 0,2, NaCl – 0,1, NH_4Cl – 1,0, $Na_2MoO_4 \times 12H_2O$ – 0,002, $FeSO_4$ (в хелатном комплексе с этилендиаминтетрауксусной кислотой) – 0,02, агар-агар – 15 (рН доводили NaOH до 7,0) в течение 18 часов при 35 °С, переносили в стерильный фосфатно-солевой буфер до оптической плотности 0,5 при 660 нм и полученную суспензию клеток вносили в стерильный фосфатно-солевой буфер в соотношении 1:40 (v/v). Содержание бактериальных клеток было 10^8 кл./мл. Затем полученные бактериальные суспензии были добавлены в среду культивирования микрорастений – 1:100 (v/v) на разных этапах культивирования растений *in vitro*: 1) в начале культивирования (при черенковании) – нулевой день; 2) в середине стадии *in vitro* – 15-й день.

В конце культивирования микрорастений в условиях *in vitro* (30-й день) проводили определение длины побега и корней, а также числа узлов и корней.

Полученные данные подвергали статистической обработке методом однофакторного дисперсионного анализа со сравнением частных средних по тесту Дункана с использованием пакета программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции Agros, версия 2.10. Достоверность результатов подтверждена трехкратным повторением экспериментов.

Результаты и обсуждение

Использованные в работе бактериальные культуры ризосферных штаммов обладают разными биохимическими свойствами, проявляющимися, в частности, при внесении бактериальных культур в среду Мурасиге – Скуга. Штамм *Azospirillum brasilense* Sp7, подобно штамму *Azospirillum brasilense* Sp245 (Крицкая с соавт., 2017) [4], не вызывал помутнение среды культивирования растений на всем протяжении эксперимента *in vitro*. О присутствии жизнеспособных бактериальных клеток на 15- и 30-е дни после инокуляции можно было судить только в тестерных экспериментах по бактериальному обрастанию фрагментов корней на плотной питательной среде с иммунохимической идентификацией культуры. Бактерии в свободном состоянии в питательной среде не обнаруживались.

Совершенно другой эффект наблюдался после внесения в среду Мурасиге – Скуга инокулята *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Вне зависимости от стадии развития микрорастений через сутки визуально после инокуляции был установлен бактериальный рост с характерным помутнением среды культивирования. Иммунохимическими методами клетки *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 выявлялись и на корнях микрорастений и в среде культивирования. В связи с этим продолжение работы было связано с изучением влияния на микрорастения *in vitro* бактериальной инокуляции обеими ростстимулирующими бактериями при бактеризации в различные сроки их культивирования: на стадии черенкования (0 сутки) и середины стадии *in vitro* (15-е сутки).

При инокуляции ризобактериями штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 микрорастений картофеля на стадии черенкования было найдено ростстимулирующее действие микроорганизмов на все исследованные параметры (+64% – длина побега; +60% – длина корня; +33% – количество узлов; +58% – количество корней) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние инокуляции штаммом *Azospirillum brasilense* Sp7 (0 сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	57,50a	47,25a	7,55a	5,05a
Инокуляция штаммом Sp7	94,50b	75,50b	10,05b	8,00b
$F_{\text{фак}}$	4107,000*	2016,158*	1251,327*	3484,690*
$НСР_{0,05}$	1,837	2,002	0,225	0,159

Примечание: * – значения критерия Фишера, удовлетворяющие условию $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$ при уровне значимости 95% ($p \leq 0,05$). Достоверно различающиеся варианты по тесту Дункана обозначены разными буквами

Таблица 2

Влияние инокуляции штаммом *Azospirillum brasilense* Sp7 (15-е сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корней, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	89,05a	62,55	9,00	7,65a
Инокуляция штаммом Sp7	106,00b	64,10	9,15	8,75b
F _{факт.}	314,650*	1,321	0,074	33,179*
НСР _{0,05}	12,070	-	-	0,766

Примечание: * – значения критерия Фишера, удовлетворяющие условию $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$ при уровне значимости 95% ($p \leq 0,05$). Достоверно различающиеся варианты по тесту Дункана обозначены разными буквами

При инокуляции штаммом *Azospirillum brasilense* Sp7 на 15-е сутки культивирования микрорастений картофеля *in vitro* был выявлен значительно более слабый ростстимулирующий эффект: достоверное увеличение наблюдалось только в длине побега (+19%) и в количестве корней (+14%) (табл. 2).

Таким образом, для инокуляции микрорастений ростстимулирующим штаммом *Azospirillum brasilense* Sp7 наиболее оптимальным нами был признан вариант с внесением бактерий на стадии черенкования.

Инокуляция микрорастений картофеля *in vitro* на стадии черенкования штаммом *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 приводила к бактериальному «заращению» среды и ингибированию развития мериклонов. К концу стадии

in vitro инокулированные микрорастения картофеля развивались, но по морфометрическим показателям отставали от стерильных (неинокулированных) микрорастений (-22% – длина побега; -52% – длина корня; -20% – количество корней) (табл. 3).

В то же время инокуляция бактериями штамма *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 микрорастений картофеля в середине стадии *in vitro* сопровождалась проявлением ростстимулирующих свойств этих бактерий (+34% – длина побега; +7% – количество узлов; +16% – количество корней) (табл. 4). Единственным показателем, для которого было установлено достоверное ингибирование при инокуляции, была длина корня микрорастений (-8%).

Таблица 3

Влияние инокуляции штаммом *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 (0 сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	51,00 b	42,00 c	5,5	4,5 b
Инокуляция штаммом IPA7.2	39,67 a	20,00 a	5,3	3,6 a
F _{факт.}	355,480*	1970,454*	0,354	1083,597*
НСР _{0,05}	2,095	1,523	-	0,092

Примечание: * – значения критерия Фишера, удовлетворяющие условию $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$ при уровне значимости 95% ($p \leq 0,05$). Достоверно различающиеся варианты по тесту Дункана обозначены разными буквами

Таблица 4

Влияние инокуляции штаммом *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) на морфометрические показатели микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*

Вариант	Длина побега, мм	Длина корня, мм	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.
Контроль	53,45a	78,50b	8,05a	7,10a
Инокуляция штаммом IPA7.2	71,50 b	72,25a	8,60 b	8,25b
F _{факт.}	3940,408*	101,400*	33,045*	31,117*
НСР _{0,05}	0,915	2,054	0,304	0,656

Примечание: * – значения критерия Фишера, удовлетворяющие условию $F_{\text{факт.}} \geq F_{\text{теор.}}$ при уровне значимости 95% ($p \leq 0,05$). Достоверно различающиеся варианты по тесту Дункана обозначены разными буквами

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что ростстимулирующий потенциал бактерий *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 проявляется только при инокуляции сформировавшихся микрорастений картофеля, в то время как бактериализация черенков картофеля отрицательно сказывается на развитии микрорастений. Возможно, быстрое размножение бактерий приводит к усилению микробного действия, что отрицательно влияет на морфогенетические процессы в растительных тканях, необходимые для формирования микрорастения из черенка. Отсутствие негативного влияния бактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 на растения при инокуляции на стадии черенкования может быть обусловлено как низкой концентрацией бактериальных клеток в связи с неспособностью азоспирилл развиваться на среде Мурасиге – Скуга (Крицкая с соавт., 2017) [4], так и с низким уровнем активации фитоиммунных реакций клетками азоспирилл, обусловленным особенностями строения их биополимеров (Бурьгин с соавт., 2007 [2]; Belyakov et al., 2012 [6]; Evseeva et al., 2011 [7]).

Особого внимания заслуживает положительное влияние ризобактерий штамма *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 при значительном бактериальном зарастании среды культивирования растений при инокуляции в середине стадии *in vitro*. Активное размножение ростстимулирующих бактерий в среде культивирования растений не приводит к торможению роста растений, а даже, наоборот, его стимулирует.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ростстимулирующий эффект ризосферных бактерий при инокуляции ими микрорастений картофеля в культуре *in vitro* специфичен в отношении условий инокуляции. Бактерии, неспособные к самостоятельному росту на питательной среде для культивирования микрорастений (в данном случае *Azospirillum brasilense* Sp7), могут эффективно инокулировать микрочеренки картофеля с первых дней культивирования *in vitro* для стимулирования роста побегов и корней. Бактерии, активно растущие в питательной среде, могут использоваться как ростстимулирующие, но инокуляцию микрорастений необходимо проводить во второй половине периода культивирования *in vitro*. При разработке агробиотехнологии микрклонального размножения растений введение приема бактериализации микрорастений может быть эффективным с учетом

специфики методики инокуляции применяемого штамма ростстимулирующих ризобактерий.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ 16-04-01444.

Литература

1. Бурьгин Г.Л., Попова И.А., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2 // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 1. – С. 105–115. doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.105rus.
2. Бурьгин Г.Л., Широков А.А., Шелудько А.В., Кацы Е.И., Щеголев С.Ю., Матора Л.Ю. Выявление чехла на поверхности полярного жгутика *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 6. – С. 822–829. doi: 10.1134/S0026261707060124.
3. Деменко В.И., Лебедев В.Г. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Изв. ТСХА. – 2011. – Вып. 1. – С. 60–70.
4. Крицкая Т.А., Евсева Н.В., Бурьгин Г.Л., Кашин А.С., Щеголев С.Ю. Использование *Azospirillum brasilense* Sp245 для повышения эффективности микрклонального размножения смолевки меловой (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.) // Биотехнология – 2017. – Т. 33. – № 1. – С. 72–79. doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-72-79.
5. Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) // Plant Soil. – 2014. – Vol. 378. – P. 1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x.
6. Belyakov A.E., Burygin G.L., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Selivanov N.Yu., Matora L.Yu., Knirel Yu.A., Shchyogolev S.Yu. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7 // Carbohydr. Res. – 2012. – Vol. 361. – P. 127–132. doi.org/10.1016/j.carres.2012.08.019.
7. Evseeva N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Dmitrienko V.V., Shchyogolev S.Yu. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells // Plant Soil. – 2011. – Vol. 346(1–2). – P. 181–188. doi: 10.1007/s11104-011-0808-9.
8. Lareen A., Burton F., Schäfer P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes // Plant Molecular Biology. – 2016. – Vol. 90(6). – P. 575–587. doi: 10.1007/s11103-015-0417-8.
9. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu.

Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum* // Agron. Sustain. Dev. – 2015. – Vol. 35(3). – P. 1167–1174. doi: 10.1007/s13593-015-0304-3.

10. Vettori L., Russo A., Felici C., Morini S., Toffanin A. Improving micropropagation: effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree // J. Plant Interact. – 2010. – Vol. 5. – P. 249–259.

PECULIARITIES OF PLANT INOCULATION WITH RHIZOSPHERE BACTERIA AS A FACTOR INCREASING THE EFFICACY OF POTATO MICROCLONAL PROPAGATION

G.L. BURYGIN^{1,2}, K.Y. KARGAPOLOVA², N.V. EVSEEVA¹, O.V. TKACHENKO²

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS,

² Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov

Plant microclonal propagation *in vitro* is the main method used to produce healthy planting material of food and ornamental plants. One way to increase the adaptation potential of microplants in non-sterile soil is to inoculate the plants with beneficial bacteria after culturing *in vitro*. Here we used two rhizosphere strains, *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, when after in their biochemical characteristics, to examine the growth-promoting effects of bacterial inoculation on potato microclones at different times of culturing *in vitro*. We found that inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp7, unable to grow on Murashige and Skoog's medium, was most effective at the stage of plant grafting. By contrast, inoculation of potato microplants with *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 was optimal halfway into the culturing *in vitro*.

Keywords: potato, microclonal propagation, plant-growth-promoting rhizobacteria, *in vitro*

ВЫЯВЛЕНИЕ И ДЕКОНТАМИНАЦИЯ МИКОПЛАЗМА-ИНФЕКЦИИ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

И.Ф. РАДАЕВА, Н.С. КУЦЕРУБОВА*, А.О. СЕМЕНЦОВА,
К.Э. ТРИФОНОВА, М.П. БОГРЯНЦЕВА, С.В. УСОВА, Е.А. НЕЧАЕВА

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
р.п. Кольцово, Новосибирской области

Проведено исследование на отсутствие микоплазма-контаминации перевиваемых культур клеток человека. Разработана схема деконтаминации клеток от микоплазменной инфекции. Ципрофлоксацин в концентрации 10 мкг/мл полностью подавляет рост микоплазм, не оказывает существенного влияния на культуральные, морфологические показатели клеток в культуре, инфицирование культур клеток микоплазмами не возобновляется. Нами проведено сравнение методов выявления микоплазм в процессе деконтаминации культур клеток методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и люминесцентной микроскопией. Показано, что оба метода позволяют выявлять наличие микоплазмы в одинаковой степени. Однако для контроля процесса деконтаминации культур клеток целесообразнее использовать ПЦР-анализ.

Ключевые слова: культура клеток, микоплазмы, ципрофлоксацин, деконтаминация, метод полимеразной цепной реакции.

Введение

В настоящее время клеточные культуры находят все более широкое применение в производстве различного спектра диагностических и противовирусных препаратов. Для получения высокоактивных препаратов необходимо использовать чистое, не контаминированное сырье (культуру клеток, сыворотку крови, питательные среды). В качестве клеточного субстрата широко используют первичные культуры и перевиваемые линии клеток. Основной причиной производственного брака является контаминация клеточного субстрата различными агентами. Наибольшую опасность для клеточных культур представляют микоплазмы [7, 14]. Во многих случаях контаминация такого рода протекает бессимптомно. Тем не менее латентное присутствие микоплазм существенно влияет на метаболизм клеток, вызывает хромосомные aberrации и изменяет клеточные функции. Микоплазменная контаминация, проявляясь в культурах клеток человека и животных, культивируемых *in vitro*, является причиной гибели клеточных культур и потенциальным источником артефактов в цитологических и биохимических

экспериментах [16]. Установлено, что уровень контаминации первичных культур и перевиваемых линий клеток достигает в различных коллекциях РФ и мира от 45 до 96% [1, 4]. Однако истинная распространенность микоплазменной инфекции клеточных культур может быть выше, чем публикуемые данные, так как чувствительность методов, применяемых для тестирования, различна. В связи с этим строгий контроль за возможными контаминациями клеточных культур при производстве вакцинных и других препаратов признан в настоящее время необходимым [9]. ВОЗ и российское здравоохранение предъявляют чрезвычайно высокие требования к клеточному субстрату, используемому при производстве биологически активных препаратов, особенно по уровню контаминации вирусами и микоплазмами. В связи с этим освобождение клеточных линий от микоплазм представляет собой очень сложную и актуальную задачу.

Сообщения о попытках деконтаминировать клеточные культуры известны, но большая их часть свидетельствует о неудачах [2, 10]. В случае контаминации микоплазмой широко распространенных клеточных линий наиболее эффективным способом борьбы с инфекцией является полное уничтожение зараженного материала с последующей заменой. Однако существуют уникальные клеточные линии, обладающие ценными свойствами, потеря которых невозможна. В таких случаях усилия должны быть направлены на проведение деконтаминации культур клеток. Наибольшее распространение очистки культур клеток от микоплазм полу-

© 2018 г. Радаева И.Ф., Куцерубова Н.С., Семенцова А.О., Трифонова К.Э., Богрянцева М.П., Усова С.В., Нечаева Е.А.

* **Автор для переписки:**

Куцерубова Наталья Сергеевна

мл.н.с. Отдела биологического и технологического контроля ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

E-mail: paloma2019@yandex.ru

чил метод с помощью противомикробных препаратов широкого спектра действия.

Таковыми являются препараты фторхинолонового ряда (энрофлоксацин, норфлоксацин, пefлоксацин, флюмеквин и т.д.) в высоких концентрациях (100,0 мкг/мл), которые обладают выраженным цитотоксическим действием на культуру клеток. Максимальная нетоксическая концентрация для энрофлоксацина составляла 50,0–40,0 мкг/мл, норфлоксацина — 75,0–50,0 мкг/мл, пefлоксацина — 75,0–50,0 мкг/мл, флюмеквина — 25,0 — 20,0 мкг/мл [3].

Предложены различные химиотерапевтические препараты монофторхинолонового ряда и, в частности, ципрофлоксацин, который блокирует действие фермента ДНК-гиразы, что приводит к ингибированию биосинтеза ДНК, глубоким структурным изменениям клеточной стенки, цитоплазмы, нуклеоида и в итоге к выраженному бактерицидному эффекту в отношении микоплазм [5]. Ципрофлоксацин не оказывает цитотоксического и генотоксического действия на культивируемые клетки, с его помощью был очищен от микоплазм ряд ценных клеточных линий [6].

Для выявления микоплазма-инфекции применяют различные методы. Основные методы выявления микоплазм следующие: микробиологический высеv на селективные питательные среды, окраска клеток флуорохромами Hoechst 33258, Dapi или оливомицином, автордиография, электронная микроскопия и ПЦР-анализ. Наиболее приемлемым для экспресс-индикации микоплазм в культуре клеток представляется метод прямого флуоресцентного окрашивания клеток с использованием люминесцентной микроскопии в сочетании с окрашиванием ДНК интеркалирующими флуорохромами. Данный способ по чувствительности равноценен микробиологическому методу, соответствующему 105 микоплазм на 1 мл культуральной среды (и выше) [12], и дает стабильные результаты, позволяя обнаруживать микоплазмы в культурах клеток при сравнительно низкой множественности инфекции [2]. В последнее время широко применяются методы ДНК-диагностики, в частности, один из ее вариантов — метод полимеразной цепной реакции. Использование ПЦР позволяет осуществлять диагностику максимально быстро, с большой точностью и специфичностью обнаруживать наиболее распространенные и изученные виды микоплазм [8]. Чувствительность метода в этом варианте составляет не менее 10 микоплазм в 10 мкл культуральной жидкости, а специфичность, обеспечиваемая второй ступенью реакции, дает возможность выявлять только микоплазмы [13].

Несмотря на то, что разные исследователи предлагали разнообразные методы и схемы деконтаминации с применением антибиотиков, эта проблема остается нерешенной в связи с тем, что используемые антибиотики оказались малоэффективны или токсичны для культур клеток. Поэтому совершенствование и разработка методов деконтаминации, особенно перевиваемых линий клеток, от микоплазм остается актуальной.

Цель работы — выявление и деконтаминация микоплазма-инфекции в перевиваемых культурах клеток человека.

Материалы и методы

В работе исследовали следующие перевиваемые линии клеток человека: 293 — почка эмбриона, трансформированная ДНК аденовируса 5-го типа; A431 — эпидермоидная карцинома; Alexander-карцинома печени; AMH — амнион; CaSki — карцинома шейки матки; CCRF-CEM — лимфобластоидная лейкемия; Changliver — печень; Clone1-5c-4 — нормальная конъюнктивa; Detroit6 — костный мозг грудины; EJ (MGH-U1) — карцинома мочевого пузыря; F1 — амнион; H 143 ТК — остеосаркома, клетки, дефицитные по тимидинкиназе; HeLa — карцинома шейки матки; HeLa229 — карцинома шейки матки, сублиния клеток HeLa; HeLa (Ohio) — карцинома шейки матки, сублиния клеток HeLa; HeLaS3 — карцинома шейки матки, сублиния клеток HeLa; HeLaTK — карцинома шейки матки, сублиния клеток HeLa, клетки, дефицитные по тимидинкиназе; Hep-2 — карцинома гортани; HepG2 — карцинома печени; HOS — остеосаркома; HuT 102 — лимфома; IMR-32 — нейробластома; K-562 — хроническая миелогенная лейкемия; KB — карцинома полости рта; L-132 — легкое эмбриона; MT-4 — совместно культивируемые лимфоциты из крови сердца и периферической крови больных Т-клеточной лейкемией; Namalwa — лимфома; NC-37 — лимфобласты периферической крови здорового донора; Raji — лимфома; RD — рабдомиосаркома; RH — почка эмбриона; RPMI2650 — карцинома носовой перегородки; RPMI8226 — миелома; SiHa — карцинома шейки матки; SW-13 — аденокарцинома надпочечника; U-937 — гистиоцитарная лимфома; Vero — эпителий почки (зеленая мартышка); MDCK — почка (собака); L929 — фибробласты (мышь).

Для выращивания клеточных культур использовали питательную среду Игла MEM или RPMI-1640 производства ГУП «Институт полиомиелита и вирусных

энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН (Россия) с 10% сыворотки крови плодов коровы («Gibco», США). Криоконсервацию клеток проводили в этой же среде с добавлением 10% глицерина («ICN Biomedicals», США). Клеточные культуры хранили при температуре минус 196 °С в жидком азоте. Посевная концентрация составляла $(1,0-2,0) \times 10^6$ клеток в 1 мл, кратность посева 1:3 – 1:4, частота пассирования – 3–4 сут. Для посева клеток в качестве диспергента применяли 0,25%-ный раствор Трипсина («Sigma», США) и 0,02%-ный раствор Версена (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в соотношении 1:2.

Для деконтаминации культур клеток от микоплазм использовали ципрофлоксацин производства («КРКА», Словения) в дозе 5 и 10 мкг/мл. Клетки культивировали в течение 3–10 последовательных пассажей в питательной среде с добавлением ципрофлоксацина, затем на протяжении 5 пассажей – в среде без добавления ципрофлоксацина. В процессе работы учитывали кратность посева, частоту пассирования, морфологию и жизнеспособность культуры клеток.

Контроль культур клеток на отсутствие микоплазм проводили методом люминесцентной микроскопии в сочетании с окрашиванием 0,0005%-ным раствором Hoechst-33258 («Sigma», США) [1, 2] и ПЦР [11]. Для постановки метода ПЦР использовали образцы культур клеток в концентрации 1×10^6 клеток. Идентификация геномной ДНК микоплазмы осуществлялась с помощью пары праймеров GPO1 и MGSO (ООО «Биосинтез», Россия), специфичных для выявления следующие видов микоплазм: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma buccale*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma salivarium* [15]. Положительным контролем служили клетки Vero, инфицированные микоплазмой; отрицательным контролем – деионизованная вода, маркер молекулярного веса фирмы «Fermentas» (США).

Результаты и обсуждение

Первый этап исследования заключался в обнаружении микоплазменной контаминации в клеточных культурах. Для этого были использованы два метода выявления: метод люминесцентной микроскопии в сочетании с окрашиванием 0,0005%-ным раствором Hoechst-33258 и ПЦР. Было установлено, что культуры клеток 293,

A431, CCRF-CEM, Changliver, Clone1-5c-4, Detroit6, EJ (MGH-U1), F1, H143 TK-, HeLa, HeLa (Ohio), HeLaS3, Hep-2, HepG2, HOS, HuT102, IMR-32, K-562, KB, L-132, MT-4, Namalwa, NC-37, Raji, RD, RH, RPMI2650, RPMI8226, SiHa, SW-13, U-937, Vero, MDCK – свободны от микоплазм (рис. 1, 2).

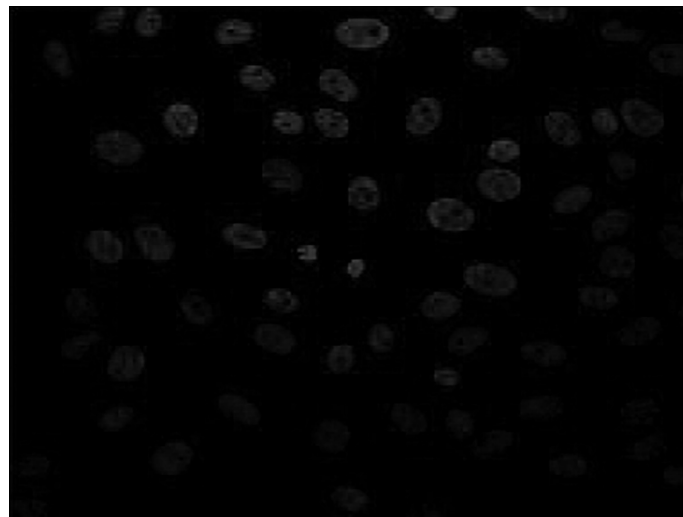


Рис. 1. Выявление микоплазм методом флуоресцентной микроскопии – культура клеток Vero (свободны от микоплазм). Окрашивание DAPI. Увел. 40×

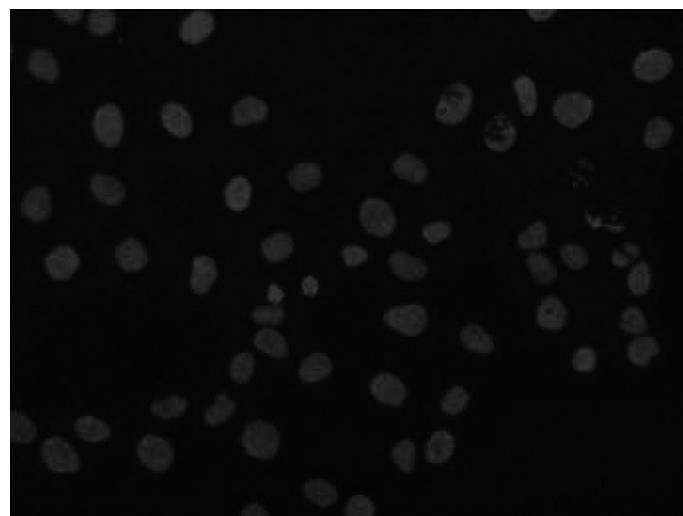


Рис. 2. Выявление микоплазм методом флуоресцентной микроскопии – культура клеток MDCK (свободны от микоплазм). Окрашивание DAPI. Увел. 40×

При микроскопировании препаратов, окрашенных красителем Hoechst-33258, было найдено, что культуры клеток Alexander, AMH, CaSki, HeLa229, L929, HeLaTK- контаминированы микоплазмой. Микоплазмы обнаружены в виде мелких гранул, скоплений или нитевидных образований яркого зеленого свечения, расположенных вне клеток или на их поверхности (рис.

3). Иногда встречались более крупные одиночные тела, а также скопления микоплазм по границам клеток и в межклеточном пространстве. Результаты, полученные методом люминесцентной микроскопии, подтверждались данными ПЦР-анализа (рис. 4). О наличии микоплазм в исследуемых культурах клеток свидетельствовало установление участка длиной 720 п.н. Таким образом, сравнительное исследование двух методов выявления микоплазмы свидетельствует, что результаты, полученные методом люминесцентной микроскопии и ПЦР, полностью совпадают.

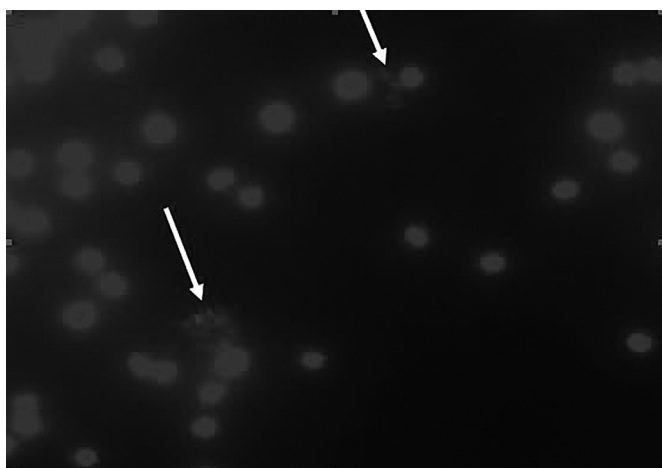


Рис. 3. Выявление микоплазм методом флуоресцентной микроскопии — культура клеток L929 (контаминированная микоплазмами: указано стрелками). Окрашивание Hoechst 33258. Увел. 40×

Следующий этап исследования состоял в изучении условий освобождения культур клеток от микоплазмы. Известно, что даже при «терапевтических» дозах действия антибиотиков, используемых для деконтаминации, может приводить к изменению хромосомного состава клеточных линий [3, 5]. После испытания большого числа антибиотиков был найден антибиотик — ципрофлоксацин и другие антибиотики хинолонового ряда (абактал, энросепт), применение которых в определенных дозах приводит к очистке клеточных линий от микоплазм, не оказывая при этом ни цитотоксического, ни генотоксического действия на культивируемые клетки [3, 5]. Применение ципрофлоксацина обеспечивает получение стерильных культур в 95–100% случаев.

Чувствительность различных культур клеток к определенному антибиотику может быть разной; поэтому предварительно нужно подбирать оптимальную дозу, при которой микоплазма погибнет, а клетки останутся жизнеспособными. Мы в исследовании для деконтаминации культур клеток Alexander, АМН, CaSki, HeLa229,

HeLaTK-от микоплазм использовали противомикробный препарат широкого спектра действия ципрофлоксацин в двух концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл.

Применение ципрофлоксацина в дозе 5 мкг/мл в течение 5–10 последовательных пассажей не вызывало изменений в морфологии и жизнеспособности клеток. Однако применение антибиотика в концентрации 5 мкг/мл не приводило к полному освобождению клеточной культуры от микоплазм. С помощью люминесцентной микроскопии были выявлены единичные микоплазмы в поле зрения. Наличие микоплазмы подтверждалось также и данными ПЦР-анализа. В дальнейшем через 2–3 пассажа концентрация микоплазмы вновь достигала прежних значений.

При применении для деконтаминации культур клеток Alexander, АМН, CaSki, HeLa229, HeLaTK-ципрофлоксацина в дозе 10 мкг/мл в течение 3–5 последовательных пассажей были отмечены изменения в морфологии и жизнеспособности культур. Наблюдали неспецифическую дегенерацию культур клеток, которая проявлялась в грануляции цитоплазмы, потемнении и округлении клеток, к утрате связи клеток между собой. При этом кратность посева снижалась до 1:2, частота пассирования увеличивалась до 7–10 суток, жизнеспособность клеток составляла 50%. Дальнейшее культивирование клеток в питательной среде без добавления ципрофлоксацина приводило к полному восстановлению свойств культур клеток. Культуры клеток приобретали типичную для данных линий морфологию, кратность посева на 3–4-е сутки роста составляла 1:3 – 1:4, жизнеспособность — 75–85%. Ципрофлоксацин в концентрации 10 мкг/мл полностью подавлял рост микоплазм, при этом не оказывал существенного влияния на культуральные и морфологические показатели клеток в культуре; контаминация культур клеток микоплазмами не возобновлялась. Очищенные от микоплазм клеточные культуры Alexander, АМН, CaSki, HeLa229, HeLaTK-были размножены, криоконсервированы и заложены на хранение при температуре минус 196 °С. При восстановлении культур клеток после криоконсервации и культивирования в течение 10 последовательных пассажей клетки вновь проверяли на отсутствие микоплазм. Микоплазмы в обработанных культурах клеток не были обнаружены. Деконтаминация с помощью ципрофлоксацина в дозе 10 мкг/мл была успешной в результате трех- и пятикратной обработки культур клеток, инфицированных микоплазмой. Достоверность результатов, полученных с помощью люминесцентной микроскопии, была подтверждена методом ПЦР (см. рис. 4 и рис. 5).

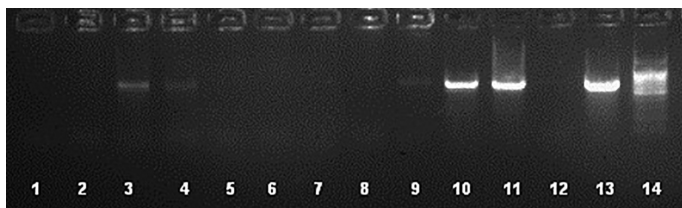


Рис. 4. Выявление микоплазм методом ПЦР в культурах клеток до деконтаминации. 1 – EJ (MGH-U1); 2 – CCRF CEM; 3 – AMH; 4 – CaSki; 5 – Detroit 6; 6 – Hep-2; 7 – HepG2; 8 – HuT102; 9 – HeLa229; 10 – HeLaTK; 11 – Alexander; 12 – K⁻-отрицательный контроль; 13 – K⁺-положительный контроль; 14 – M-маркер молекулярной массы – GeneRuler 100 bp DNA Ladder – Thermo Scientific

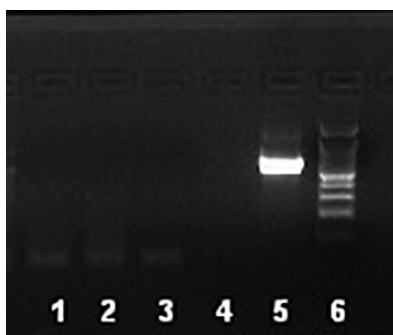


Рис. 5. Выявление микоплазм методом ПЦР в культурах клеток после деконтаминации. 1 – AMH; 2 – Alexander; 3 – HeLaTK; 4 – K⁻-отрицательный контроль; 5 – K⁺-положительный контроль; 6 – M-маркер молекулярной массы – GeneRuler 100 bp DNA Ladder – Thermo Scientific

Проведенное сравнительное исследование по изучению двух методов выявления микоплазменной контаминации клеточных культур свидетельствует, что оба метода эффективны и результаты, полученные с помощью люминесцентной микроскопии, подтверждаются данными ПЦР-анализа. Однако следует отметить, что метод ПЦР более универсален, так как позволяет проводить оценку деконтаминированных культур клеток быстро, с большой точностью и специфичностью. Техника ПЦР основана на повторяющихся циклах денатурации матричной ДНК, отжиге с праймерами-олигонуклеотидами и синтезе новых цепей ДНК с участием термостабильного фермента полимеразы. В результате каждого цикла число молекул ДНК удваивается, благодаря чему чувствительность метода позволяет достоверно и специфично выявлять присутствие в клетках даже единичных микоплазм. Метод люминесцентной микроскопии в сочетании с окраской ДНК интеркалирующими флуорохромами также считается одним из наиболее надежных,

простых и быстрых, занимает не более часа. Однако применение его на протяжении первых 3–4 пассажей после деконтаминации культур клеток невозможно. В процессе обработки ципрофлоксацином клетки начинают захватывать краситель Hoechst-33258 и так пропитываются им, что обнаружить микоплазмы на фоне окрашенной цитоплазмы затруднительно. После деконтаминации клеток от микоплазм для избавления клеток от остатка ципрофлоксацина необходимо провести 5 последовательных пассажей в питательной среде без добавления препарата. При использовании ПЦР для выявления микоплазмы достаточно одного пассажа после деконтаминации. В связи с этим предпочтение следует отдать методу ПЦР.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что применение ципрофлоксацина в дозе 10 мкг/мл в течение 3–5 последовательных пассажей полностью освобождает перевиваемые культуры клеток человека от микоплазменной инфекции. После деконтаминации клеточные культуры Alexander, AMH, CaSki, HeLa229, HeLaTK⁻, очищенные от микоплазм-контаминантов, размножены и заложены на длительное хранение. Показано, что при сравнении методов выявления микоплазм в процессе деконтаминации культур клеток целесообразнее использовать ПЦР-анализ.

Литература

1. Бердникова З.Е. Разработка и стандартизация методов выявления микоплазм контаминантов медицинских биологических препаратов: дис. канд. биолог. наук. – М., 1991. – 136 с.
2. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. – СПб., 2002.
3. Брагина С.Г. Действие некоторых фторхинолоновых препаратов на микоплазмы-контаминанты клеточных культур: дис. ... канд. биол. наук. – М.: Московский государственный университет прикладной биотехнологии, 2001. – 134 с.
4. Малахова М.С. Макаров В.В. Вирусы, встречающиеся в клеточных культурах животного происхождения // Вопр. вирусологии. – 1986. – Т. 31. – № 6. – С. 736–739.
5. Ночевный В.Т., Новохатский А.С., Карпухина О.Г. Профилактика и методы деконтаминации клеточных культур от бактерий и микоплазм при помощи фторхинолонов (обзор)

- / Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Вып. 17. — СПб., 2002. — С. 9–15.
6. Пинаев Г.П., Полянская Г.Г. Создание и развитие российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Вып. 26. / Отв. ред. М.С. Богданова. — СПб: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. — 61 с.
 7. Полянская Г.Г., Ефремова Т.И., Эндер Н.А. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии лейомиосаркомы человека SK-UT-1B на кариотипическую структуру // Цитология. — 1998. — Т. 40. — № 1. — С. 23–30.
 8. Радаева И.Ф., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г. Коллекция культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. — Новосибирск, 2009.
 9. Усова С.В., Богрянцева М.П., Куцербубова Н.С., Гамидова И.С., Радаева И.Ф., Нечаева Е.А. Контаминация микоплазмами культуральных вирусных вакцин // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. — 2014. — Т. 12. — № 4. — С. 59–67.
 10. Шалунова Н.В., Волкова Р.А., Волгин А.Р., Петручук Е.М., Бердникова Э.Е., и др. Микоплазмы — контаминанты клеточных культур // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. — 2016. — Т. 16. — № 3(59). — С. 151–160.
 11. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., Зайцев К.В., Егорова А.Б., Шахова С.С., Загребин Л.В., Волгушев С.А. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. — Томск, 2004.
 12. Drexler H.G., Uphoff C.C. Contamination of cell culture, Mycoplasma // Encyclopedia of cell technology / Ed. by R.S. Spier. — N.Y.; Toronto, 2000. — Vol. 1. — P. 609–627.
 13. Harasawa R., Uemori T., Asada K., Kato I. Sensitive detection of mycoplasmas in cell cultures by using two-step polymerase chain reaction // Rapid diagnosis of mycoplasmas / Eds. I. Kahane, A. Adoni. — N.Y.; London, 1993. — P. 227–232.
 14. Langdon S.P. Cell culture contamination: an overview // Methods Mol. Med. — 2004. — Vol. 88. — P. 309–317.
 15. Pruckler J.M., Pruckler J.M., Ades E.W. Detection by polymerase chain reaction of all common *Mycoplasma* in a cell culture facility // Pathobiology. — 1995. — Vol. 63. — P. 9–11.
 16. Rottem S., Barile M. Beware of mycoplasmas // Trends. Biotechnol. — 1993. — Vol. 11. — P. 143–151.

DETECTION AND DECONTAMINATION OF MYCOPLASMA INFECTIONS IN CONTINUOUS CELL CULTURES OF HUMAN

I.F. RADAIEVA, N.S. KUTSERUBOVA, A.O. SEMENTSOVA, K.E. TRIFONOVA,
S.V. USOVA, E.A. NECHAEVA, M.P. BOGRYANTSEVA

State Research Centre of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region

A study was conducted on the absence of mycoplasma-contamination of transplantable human cell cultures. A scheme for decontamination of cells from mycoplasmal infection has been developed. Ciprofloxacin at a concentration of 10 µg/ml completely inhibits the growth of mycoplasmas, does not significantly affect the cultural, morphological indices of cells in culture, the infection of cell cultures with mycoplasmas does not resume. We compared the methods for detecting mycoplasmas in the process of decontamination of cell cultures by polymerase chain reaction (PCR) and luminescence microscopy. It is shown that both methods allow to detect the presence of mycoplasma in the same degree. However, to control the process of decontamination of cell cultures, it is more appropriate to use PCR analysis.

Keywords: cell culture, mycoplasma, ciprofloxacin, decontamination, polymerase chain reaction.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЦИДА РОСИМА GT ПРОТИВ МИКРОБНОГО ПОРАЖЕНИЯ АРАБОГРАФИЧЕСКИХ РУКОПИСЕЙ

Г.В. НАДЕЕВА*, Г.Д. ЛАТЫПОВА, Г.Ю. ЯКОВЛЕВА

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Арабографические рукописи, хранящиеся в восточном секторе Отдела рукописей и редких книг научной библиотеки (ОРРК НБ) им. Н.И. Лобачевского Казанского федерального университета (КФУ), в значительной степени повреждаются за счет механического разрастания мицелия микроскопических грибов. В повреждение также вносят вклад метаболиты микромицетов, в основном органические кислоты. Биоциды, подавляя рост микроорганизмов, оказывают неоднозначное влияние на их метаболизм. В настоящей работе охарактеризовано действие биоцида Росима GT, рекомендованного для обработки бумаги, по отношению к выживаемости микроорганизмов, обсеменяющих страницы и обложку рукописи, и изучено его влияние на синтез органических кислот и пигментов идентифицированных доминантных грибов-деструкторов.

Ключевые слова: арабографические рукописи, биоцид Росима GT, органические кислоты.

Введение

Арабографические рукописи, датированные XVII–XIX веками, хранятся в восточном секторе ОРРК НБ им. Н.И. Лобачевского КФУ, их бумага и чернила требуют особо бережного отношения. Многие из них достаточно сильно повреждены биодеструкторами, в основном микромицетами. Федеральный центр консервации библиотечных фондов (ФЦКБФ), имеющий огромный опыт по восстановлению и сохранению рукописей, разработал и предложил щадящий метод для дезинфекционной обработки рукописей с использованием биоцида Росима GT (Добрусина, 2014) [2].

Биоцидная обработка замедляет старение и предотвращает повреждение материалов документа, являясь основным способом защиты. Биоциды, подавляя рост микромицетов, могут не только подавлять, но и стимулировать биосинтез ряда метаболитов, определяющих устойчивость к действию стрессовых факторов, являющихся в то же время основными факторами биодеструкции. Под их воздействием может происходить стимуляция синтеза микромицетами органических кислот и пигментов (Сухаревич с соавт., 2000, 2009) [7, 8].

Органические кислоты могут снижать рН бумаги до двух (Zotti, Ferroni, 2008) [17]. Такая высокая кислотность сама по себе способствует гидролизу целлюлозы и ускоряет распад бумаги, так как переокисленная бумага буреет, становится очень хрупкой; кроме того, бумага с повышенной кислотностью чаще поражается микроскопическими грибами.

В воздухе книгохранилищ и на поверхности документов часто встречаются микромицеты *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ustus*, *Penicillium commune*, *P. aurantiogriseum*, являющиеся активными продуцентами органических кислот (Трепова, Великова, 2010) [9]. Наиболее продуктивным из них по производству лимонной кислоты является гриб *Aspergillus niger* (Magnuson, Lasure, 2004 [12]; Paragianni, 2007 [13]).

В связи с этим целью работы являлся анализ эффективности метода, предложенного ФЦКБФ, для обработки арабографической рукописи и влияние биоцида Росима GT на кислотообразующую способность изолятов микромицетов.

Материалы и методы

Материалы. В качестве модельного объекта для отработки метода и оценки эффективности действия биоцида Росима GT (смесь 2-метил-4-изотиазолинон-3-ОН и 5-хлор-2-метил-3(2H)-изотиазолинон-3-ОН в соотношении 1:3) (АСИМА, Швейцария), рекомендованного ГОСТом № 7.50-2002, была выбрана арабографическая рукописная книга второй половины XIX века, на русской бумаге, без переплета (рис. 1) из фонда Отдела рукописей

© 2018 г. Надеева Г.В., Латыпова Г.Д., Яковлева Г.Ю.

* **Автор для переписки:**

Надеева Галина Васильевна

ассистент кафедры биохимии и биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Институт фундаментальной медицины и биологии

E-mail: galinadeeva@yandex.ru

и редких книг Научной библиотеки им. Н.И. Лобачевского Казанского федерального университета.



Рис. 1. Арабиграфическая рукописная книга второй половины XIX века, русская бумага, без переплета

Методы. С обложки и страниц стерильными ватными тампонами с площади 1 дм^2 делали смывы водой. Смывы анализировали на наличие культивируемых форм бактерий (на МПА, ООО «Биотехновация», Электрогорск, Россия) и микромицетов (среда Чапека «Биокомпас-С», Углич, Россия). Культивирование проводили в течение 7 суток при $25\text{--}28^\circ\text{C}$. Также использовали среду Сабуро: пептон — 10 г, глюкоза — 40 г, агар — 20 г для определения количества дрожжей. Количественное содержание органических кислот микроскопических грибов проводили при выращивании их на жидкой среде Чапека: KH_2PO_4 — 0,7 г, K_2HPO_4 — 0,3 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г, NaNO_3 — 2,0 г, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 г, сахара — 30,0 г, вода — 1000 мл.

Родовую принадлежность микромицетов определяли по морфологическим показателям на микроскопе Nikon Eclipse E100 (Япония) с использованием «Определителя патогенных и условно патогенных грибов» Д. Саттона (Саттон с соавт., 2001) [6].

Идентификацию выделенных микромицетов осуществляли методом фенотипирования на автоматической системе идентификации микроорганизмов Biolog Microbial ID System (США) с системой MicroStation для идентификации мицелиальных грибов.

Целлюлазную активность микромицетов выявляли на жидкой среде Чапека с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода (Билай, 1982) [1].

Определение органических кислот, образующихся при культивировании микромицетов, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (колон-

ка Brownlee Analytical C18 ($150 \times 4,6$ мм, частицы 3 мкм), Flexar, Perkin Elmer, США). Культуральную жидкость грибов, выращенных в течение 28 суток при 30°C , наносили на колонку. Элюирование проводили при комнатной температуре в линейном градиенте при использовании системы, состоящей из раствора 10 ммоль KH_2PO_4 , доведенного ортофосфорной кислотой до $\text{pH}=2,4$ (элюент А) и ацетонитрила (элюент В). Скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин. Идентификацию пиков осуществляли при помощи УФ-детектора на длине волны 210 нм (Wilhad, 2015) [16].

Биоцид Росима ГТ для определения его влияния на образование органических кислот добавляли в среды культивирования в концентрации $1 \cdot 10^{-5}\%$.

Рукопись обрабатывали биоцидом Росима ГТ методом, предложенным ФЦКБФ. Для обработки рукописи использовали 1% раствор биоцида Росима ГТ. Проводили обеспыливание документа, очищая рукопись сухой тканью от пыли, грязи и сухих налетов грибов. Профилактическую полистную очистку выполняли марлей, смоченной в растворе биоцида. Более тщательно обрабатывали участки рукописи с видимыми налетами плесени. Текст с неводостойкими чернилами обрабатывали тонким хлопковым стержнем между буквами. Множественные участки с надписями чернилами обрабатывали тампонированием (осторожно прикладывали ватный тампон с раствором биоцида на бумагу), избегая трения по поверхности, так как чернила могут размываться водой. Затем между влажными листами рукописи прокладывали фильтровальную бумагу, смоченную биоцидом, приготовленную следующим образом: бумагу помещали в кювету с водным раствором Росима ГТ до полного пропитывания, затем слегка подсушивали. Площадь листов фильтровальной бумаги была, в среднем, на 5–10 см больше формата обрабатываемых документов, чтобы влага из внутренней части блока книги постепенно испарялась через выступающие края (рис. 2). Рукопись оставляли на сутки, проложив фильтровальной бумагой и плотно закрыв в полиэтиленовый пакет, затем просушивали в вытяжном шкафу (ФЦКБФ, 2011) [10].

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляют путем определения средних арифметических значений и их стандартных ошибок с помощью программ OriginPro и Microsoft Excel. Средние значения данных приводятся в следующем виде: $\bar{X} \pm \sigma$, где \bar{X} — среднее арифметическое, σ — среднее квадратичное отклонение. В работе все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторностях.



Рис. 2. Технология обработки рукописи биоцидом путем вложения бумажного листа с пропиткой 1% раствором биоцида в дистиллированной воде

Результаты

Анализ обсемененности рукописи до и после обработки биоцидом. Объект, на котором мы обрабатывали эффективность действия биоцида, — ру-

кописная арабиграфическая книга, — имел массовые повреждения: водные затеки, склеенные страницы, заплесневение. Анализ микробного загрязнения поверхности обложки и страницы осуществляли до обработки биоцидом Росима GT и после обработки, а также спустя год хранения обработанной рукописи. Всего с 1 дм² исследуемых поверхностей рукописи выделено 270–350 КОЕ бактерий, 215–300 КОЕ дрожжей и 480–370 КОЕ микромицетов: при этом обложка и страница мало различались по степени обсемененности (табл. 1). После обработки рукописи число высеваемых бактерий и дрожжей уменьшилось на порядок, микромицеты вообще не высевались. Через год с поверхностями рукописи, хранившейся при соблюдении температурно-влажностного режима (Попихина, 2013) [4], был сделан повторный анализ; при этом часть сохранивших жизнеспособность спор микромицетов проросла, а число бактерий выросло примерно вдвое по сравнению со свежим вариантом обработки; число дрожжей же уменьшилось еще более. Отметим, что значение исходной обсемененности рукописи не достигнуто ни в одной из групп микроорганизмов (см. табл. 1).

Таблица 1

Степень микробной загрязненности поверхности рукописи до и после обработки биоцидом Росима GT

Среда/микроорганизмы	Количество колоний, КОЕ/дм ²					
	Обложка			Страница		
Вариант	До обработки	После обработки	Через 1 год	До обработки	После обработки	Через 1 год
МПА/бактерии	350	45	110	270	25	80
Сабуро/дрожжи	300	20	5	215	20	15
Чапека/грибы	370	0	45	480	0	50

Идентификации микромицетов. Мы определили 4 доминантных микромицета как принадлежащие к роду *Aspergillus* и обозначили их соответственно как Asp8K6 — *Aspergillus niger*, Asp3K2 — *Aspergillus brasiliensis*, Asp4K3 — *Aspergillus wentii* Wehmer, Asp9K6 — *Aspergillus niger*. Учитывая, что грибы являются наиболее активными ферментативными деструкторами целлюлозы, что подтверждено нами по полной деградации фильтровальной бумаги в среде культивирования микромицетов Asp3K2, Asp4K3, Asp8K6, Asp9K6 через 12 суток, мы предположили, что снижение жизнеспособности грибов после действия биоцида приведет к убыли их целлюлазной активности.

Однако неясно, как присутствие биоцида в нетоксичной концентрации влияет на биосинтез и секрецию органических кислот.

На 28-е сутки роста в культуральной жидкости микромицетов были идентифицированы щавелевая, винная, лимонная, молочная, яблочная и уксусная кислоты, причем уровень биосинтеза и качественный состав их различались в зависимости от штаммов, хотя превалировала щавелевая кислота в концентрации от 0,48 до 0,84 г/л (табл. 2). Asp9K6 проявил себя как наиболее активный продуцент органических кислот, среди которых доминировали щавелевая (0,484 г/л), винная (0,925 г/л) и лимонная кислоты (0,518 г/л).

**Содержание органических кислот в культуральной жидкости микромицетов (г/л)
до и после воздействия биоцида Росима GT**

Кислоты	<i>Asp8K6</i>		<i>Asp3K2</i>		<i>Asp4K3</i>		<i>Asp9K6</i>	
	_*	+**	-	+	-	+	-	+
Щавелевая	0,847	0,925	0,556	0,664	0,705	0,339	0,484	1,058
Винная	0,036	0,061	0,018	0	0,218	0	0,925	0
Яблочная	0,044	0,085	0,035	0	0,005	0	0,013	0,066
Молочная	0,098	0,104	0,003	0,135	0,006	0,169	0,006	0
Уксусная	0,001	0,009	0,003	0	0,001	0,005	0,002	0,082
Лимонная	0,208	0,048	0,255	0,082	0,092	0,160	0,518	0,221

Примечание: * Среда без биоцида; ** Среда с биоцидом

Влияние биоцида на продукцию органических кислот микромицетами. Исследовали влияние биоцида на продукцию органических кислот микромицетами при культивировании на жидкой среде Чапека. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что биоцид Росима GT в низких сублетальных концентрациях влияет на продукцию органических кислот. Однако продукция

органических кислот у штаммов меняется неодинаково (рис. 3). Так, концентрация щавелевой кислоты в среде культивирования увеличивалась на 10 и 120% у штаммов *Aspergillus niger* 8K6 и *Aspergillus niger* 9K6 соответственно, тогда как у штаммов *Asp3K2* *Aspergillus brasiliensis* концентрация этой кислоты не менялась, а у штамма *Asp4K3* *Aspergillus wentii* Wehmer снижалась.

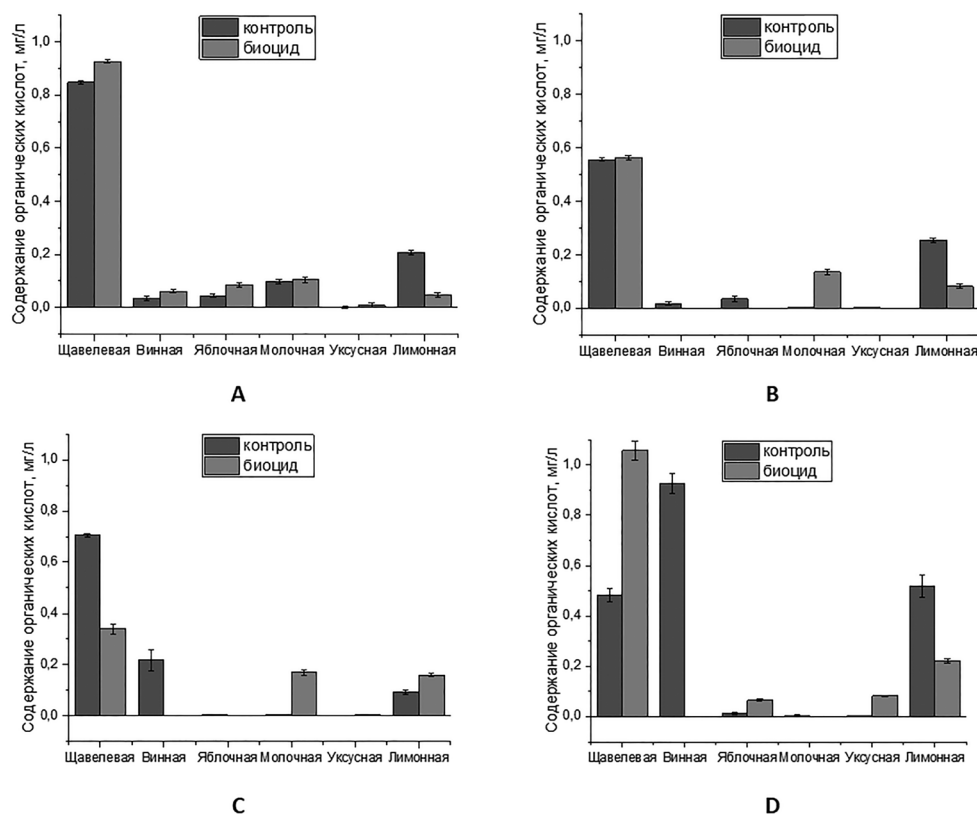


Рис. 3. Влияние биоцида на продукцию органических кислот микромицетами *Asp8K6* (А), *Asp3K2* (В), *Asp4K3* (С), *Asp9K6* (D)

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что в присутствии в среде культивирования исследуемых микромицетов низких концентраций биоцида Росима GT $1 \cdot 10^{-5}\%$ происходит изменение продукции органических кислот (см. рис. 3). Концен-

трация в среде культивирования щавелевой кислоты возрастала на 10% у штамма *Asp8K6*, на 120% у *Asp9K6* (см. рис. 3); концентрация яблочной кислоты повышалась в 3 раза у штаммов *Asp8K6* и *Asp9K6*, концентрация молочной кислоты повышалась в 10–12

раз у *Asp3K2* и *Asp4K3*, концентрация лимонной кислоты повышалась на 40% — у *Asp4K3*. В то же время присутствие в среде культивирования биоцида полностью ингибировало образование винной кислоты у всех штаммов, молочной кислоты у штамма *Asp8K6* и лимонной кислоты — на 60–70% у штаммов *Asp8K6*, *Asp3K2* и *Asp9K6*.

Обсуждение

Обработка биоцидом Росима ГТ, не повреждая материалов самой рукописи, приводила к полному подавлению роста дрожжей, частичному — бактерий и грибов. По истечении года хранения рукописи в условиях соблюдения рекомендованного температурно-влажностного режима повторный анализ выявил, что часть спор микромицетов сохранила жизнеспособность и проросла; аналогичный результат получен и для споровых форм бактерий (см. табл. 1). После года хранения число бактерий выросло примерно вдвое по сравнению с вариантом после непосредственной обработки; число дрожжей после года хранения не возросло. Это свидетельствует о пролонгированном действии биоцида Росима ГТ. В то же время необходимо отметить, что споровые формы не полностью потеряли способность к герминации под действием биоцида. Можно заключить, что использование данного метода для сильно поврежденных арабографических рукописей приемлемо, но не приводит к абсолютной стерилизации бумажных носителей арабографических текстов.

Что касается действия на кислотообразование, то мы не зафиксировали желаемого эффекта его подавления биоцидом. В основном действие биоцида приводило к уменьшению или подавлению выделения органических кислот, таких как винной кислоты, у всех штаммов, молочной кислоты — у штамма *Asp8K6* и лимонной кислоты на 60–70% — у штаммов *Asp8K6*, *Asp3K2* и *Asp9K6* (см. рис. 3).

Доминирующая в биосинтезе всех исследованных микромицетов щавелевая кислота для двух изолятов продемонстрировала снижение уровня под действием биоцида, однако для грибов *Asp8K6* и *Asp9K6* мы отметили стимуляцию ее выработки. Биоциды как известные стрессовые факторы в зависимости от концентрации могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на продукцию секретлируемых метаболитов грибов, в частности, органических кислот.

Заключение

Таким образом, можно заключить, что методика применения биоцида Росима ГТ в перспективе может быть модифицирована путем варьирования времени воздействия и концентрации биоцида с целью оптимизации обработки контаминированных рукописей. Поскольку Росима ГТ относится к веществам низкой токсичности по международным стандартам, соответствующим приблизительно IV классу опасности и VI классу токсичности по российским стандартам, увеличение времени его воздействия и концентрации может улучшить его дезинфицирующий эффект.

Литература

1. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии. — Киев: Наукова думка, 1982. — 552 с.
2. *Добрусина С.А.* Стабилизация бумаги документов / Учебное пособие. — 2014 [Электронный ресурс]: http://www.mcbs.ru/files/Stabilizatsiya_bumagi_dokumentov_1.pdf.
3. *Мамаева Н.Ю.* Исследование процесса пигментации микромицетами бумаги и полимерных композитов на ее основе: дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2001. — 163 с.
4. *Попихина Е.А.* Микробиологическое состояние воздуха. 2013 / Российская национальная библиотека [Электронный ресурс]: <http://www.nlr.ru/fdcc/publ/examination/pdf/07.pdf>.
5. *Сазанова К.В.* Органические кислоты грибов и их эколого-физиологическое значение: дис. ... канд. биол. наук. — СПб, 2014. — 159 с.
6. *Саттон Д., Фотергилл А., Ринальд М.* Определитель патогенных и условно патогенных грибов: справочное издание. — М.: Мир, 2001. — 486 с.
7. *Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г.* Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. — СПб.: ЭЛБИ-СПБ, 2009. — 207 с.
8. *Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г.* Рост микромицетов и синтез пигментов на средах, содержащих фунгициды и ингибиторы пигментообразования // Микология и фитопатология. — 2000. — Т. 42. — № 3. — С. 43–47.
9. *Трепова Е.С., Великова Т.Д.* Действие биоцидов на морфологию микромицетов // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. — 2010. — № 1. — С. 229–230.
10. Федеральный центр консервации библиотечных фондов. Обработка документов биоцидами. — ФЦКБФ, 2011 [Электронный ресурс]: <http://www.nlr.ru/fdcc/recom/bio.html>.
11. *John R.P., Nampoothiri K.M., Pandey A.* Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — Vol. 74. — P. 524–534.

12. Magnuson J.K., Lasure L.L. Organic acid production by filamentous fungi / In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Ed. by Tkacz J.S., Lange L. — New York, NY, USA: Kluwer Academic. — 2004. — P. 307–340.
13. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling // *Biotechnology Advances*. — 2007. — Vol. 25(3). — P. 244–263.
14. Peksel A., Torres N.V., Liu J., Juneau G., Kubicek C.P. ¹³C-NMR Analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 58(2). — P. 157–163.
15. Velikova T., Trepova E., Rozen T. The use of biocides for the protection of library documents: before and now // *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Microbiology Series, Formatex. — 2011. — Vol. 1(3). — P. 152–159.
16. Wilhad M.R. The analysis of a broad range of organic acids by HPLC with UV detection: application brief. — Shelton: Perkin Elmer, 2015. — 4 p.
17. Zotti M., Ferroni A. & Calvini P. Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* — 2008. — Vol. 62(2). — P. 186–194.

ESTIMATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE ROCIMA GT BIOCIDES AS AGAINST MICROBIAL DAMAGE OF THE ARABIC GRAPHIC MANUSCRIPTS

G.V. NADEEVA, G.D. LATIPOVA, G.Yu. YAKOVLEVA

Kazan Federal University

Arabic graphic manuscripts kept in the eastern sector of the Department of Rare Books and Manuscripts of the Scientific Library of N.I. Lobachevsky Kazan Federal University, are largely damaged by the mechanical expansion of the mycelium of microscopic fungi. Metabolites of micromycetes, mainly organic acids, also contribute to damage. Biocides, suppressing the growth of microorganisms, have an ambiguous effect on their metabolism. In the present work, the action of the biocide Rosim GT, recommended for the treatment of paper, with respect to the survival of microorganisms, seeding pages and the cover of the manuscript, is characterized. Its influence on the synthesis of organic acids and pigments of the identified dominant fungal destructors has been studied.

Keywords: Arabic graphic manuscripts, biocides Rosima GT, organic acids.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЫБНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ КАК ОСНОВЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИДКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ УДОБРЕНИЙ

Н.А. ГОЛУБЬ^{1*}, В.И. РЯБУШКО¹, Н.В. КАРАВАНЦЕВА¹, Л.А. РАДЧЕНКО^{1,2}, Е.В. РЕМЕСЛО²

¹ ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь;

² ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь

Белковые гидролизаты из сырья морского генеза получены с помощью ферментных бактериальных препаратов протеолитического действия. По уровню накопления аминного азота эффективность ферментативного гидролиза вдвое выше химического. При автолизе внутриклеточными катепсинами черноморского шпрота накапливается $51,37 \pm 0,53\%$ аминного азота, при гидролизе бактериальными протеазами — $60,52 \pm 1,08\%$. Содержание общего азота в рыбных гидролизатах составляет $12,02 \pm 1,60\%$, органического фосфора — $2,48 \pm 0,12$, калия — $1,55 \pm 0,06$, сухого вещества — $13,36 \pm 2,15\%$. В рыбных гидролизатах в основном преобладают алифатические аминокислоты, метионин, глутаминовая кислота и фенилаланин, а в мидийном гидролизате — глицин, лизин, треонин и серин. При однократном замачивании семян пшеницы в растворе удобрения с разведением 1:199 достигается максимальный стимулирующий эффект на развитие проростков. Прирост на 10–19% выше в сравнении с контролем. Полевые испытания жидкого органического удобрения «Фишлизат» на яровом ячмене показали, что наиболее высокие результаты получены при внесении удобрения с нормой расхода 1,0 и 1,5 л/га в фазе трубкования и колошения. Прибавка урожайности при этом составила 1,9 и 2,3 ц/га. Биометрический анализ снопового материала и учет урожая ярового ячменя показал положительное влияние удобрения на продуктивность колоса. Во всех вариантах с применением удобрений отмечена тенденция к увеличению длины колоса и массы зёрен. Удобрения с высоким содержанием аминокислот из морского сырья могут использоваться для получения экологически безопасной продукции растениеводства. Таким образом, применение гидролизатов из морского сырья способствует повышению урожайности сельскохозяйственных культур и получению экологически чистой продукции.

Ключевые слова: ферментативные гидролизаты, аминокислоты, рыба, жидкие органические удобрения, урожайность.

Введение

В современном растениеводстве одним из важных направлений является повышение эффективности удобрений. Существует ряд препаратов с использованием аминокислот, прежде всего для обработки семян, внекорневой подкормки и в качестве компонентов комплексных удобрений. Основное преимущество внекорневой подкормки заключается в том, что питательные вещества, введенные через листья, намного быстрее усваиваются растением. Внекорневая подкормка эффективна в неблагоприятный период во время вегетации растений. Такие удобрения повышают устойчивость листового аппарата к неблагоприятным факторам, увеличивают скорость роста и обеспечивают лучшее развитие растений, стимулируют

раннее цветение и формирование урожая, повышают устойчивость растений к болезням и вредителям. Стойкость подобных удобрений не оказывает заметного влияния на себестоимость сельскохозяйственной продукции [21]. Азотсодержащие соединения необходимы для осуществления полноценного метаболизма всем живым организмам. Поскольку высокомолекулярные азотсодержащие соединения не могут усваиваться растениями из почвы или через листовую поверхность, то требуется расщепить их нативную структуру до аминокислот. Этот процесс *in vitro* осуществляется под действием протеолитических ферментов как собственных, так и ферментов других видов гидробионтов [23] или, в ряде случаев, химическим гидролизом [22].

Обрастание портовых гидросооружений представляет собой сложную хозяйственную проблему. Одним из способов решения этой проблемы может служить утилизация биомассы обрастателей с помощью методов гидролиза, с получением продукции для сельского хозяйства — кормов для животноводства или органических удобрений [13]. Содержание микроэлементов в таких удобрениях будет выше, так как их

© 2018 г. Голубь Н.А., Рябушко В.И., Караванцева Н.В., Радченко Л.А., Ремесло Е.В.

* Автор для переписки:

Голубь Николай Алексеевич

к.б.н., научный сотрудник отдела аквакультуры и морской фармакологии ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь

E-mail: nickgb@yandex.ru

содержание в гидробионтах в 50–100 раз выше, чем в тканях наземных животных [12]. В структуре улова в Черном море количество мелких видов рыб достигает 80% [11]. Поскольку гидробионты чаще всего являются скоропортящейся продукцией, сложной для переработки, с большим количеством белоксодержащих отходов, то экономически оправданными методами их утилизации является получение гидролизатов. Для этих целей в качестве органических удобрений могут быть использованы мелкие морские рыбы и отходы рыбного промысла.

Цель работы — разработать технологию утилизации мелких видов рыбы и рыбных отходов методом гидролиза, а также использовать продукты переработки биомассы обрастателей гидросооружений для получения жидких органических удобрений (ЖОУ) для внекорневой подкормки растений.

Материалы и методы

В качестве сырья для получения жидких органических удобрений использованы гидробионты Черного моря — шпрот *Sprattus sprattus phalericus* R. и двусторчатый моллюск мидия *Mytilus galloprovincialis* Lam. Ферментативный гидролиз шпрота осуществляли в течение 6 ч, концентрация ферментного препарата составляла 1% от массы фарша. Дезодорирующий гидролиз в кислой среде осуществляли согласно патенту № 2604294 [16] с использованием ортофосфорной кислоты в концентрации 1–2% массовой доли удобрения. В работе использован ферментный препарат «Протолад» (ООО «Энзим», Украина, активность по протосубтилину ГХЗ 60 ед./г). Химический гидролиз шпрота и мидии проводили с использованием в качестве литического агента гидроксида натрия по технологии, описанной в патенте №53327А UA [10]. Общий азот в образцах определяли методом Дюма на анализаторе CNH 1 (производства Чехословакия) по ГОСТ Р ИСО 16634-1 [8]. Определение содержания аминного азота проводили методом формольного титрования азота аминных групп по ГОСТ 7636 [7]. Определение содержания сухих веществ проводили высушиванием в сушильном шкафу до постоянной массы согласно ГОСТ 26808 [6].

Ростовые реакции растений определяли на проростках пшеницы *Triticum aestivum* L. в лабораторных условиях при однократном замачивании семян в растворе удобрения в разведении 1:199 — 1:399 и на колеоптиле пшеницы по методике В.Н. Агнестиковой [1].

Полевые испытания действия удобрения проводили на культуре — яровой ячмень, сорт Сталкер,

в 2015 году в отделе полевых культур Института сельского хозяйства Крыма (с. Клепинино, Красногвардейского района). Почва опытного участка данного региона представлена южным слабо гумусовым черноземом с залеганием грунтовых вод на значительной глубине, не влияющих на процессы почвообразования. Мощность гумусового горизонта составляет около 28 см. Содержание гумуса в пахотном слое (0–20 см) колеблется в пределах 2,4–2,6%, валовое содержание азота — 0,18–0,20%, фосфора — 0,12–0,14%, калия — 2,1–2,4%. Содержание гидролизуемого азота — 3,0–4,0 мг, подвижного фосфора — 1,9–2,2 мг, обменного калия — 28,0–32,0 мг на 100 г почвы (по В. Мачигину [5]). Почва не засолена по всему профилю, реакция водной вытяжки слабощелочная. Механический состав легко глинистый, крупно-пылевато-иловатый. Черноземы из-за тяжелого механического состава слабо структурированы, подвержены быстрому уплотнению, характеризуются плохой влагоотдачей, имеют значительное количество почвенной влаги, недоступной растениям.

Климат степного агроклиматического района Крыма характеризуется резко выраженной континентальностью с умеренно жарким засушливым летом и умеренно-мягкой неустойчивой зимой со значительным колебанием температуры. Снежный покров незначительный, а часто и совсем отсутствует. Безморозный период длится около шести месяцев, период возможной вегетации большинства сельскохозяйственных культур — около восьми месяцев. Среднегодовая температура воздуха составляет около 10 °С.

Для выращивания ярового ячменя применяли общепринятую для степной зоны Крыма технологию. Посев осуществляли 7 марта 2015 года сеялкой СКС-6-10, площадь делянки — 25 м², повторность — четырехкратная. В опыте изучали 6 вариантов внесения жидкого органического удобрения «Фишлизат»: в фазу трубкования и колошения в дозах 0,5; 1,0 и 1,5 л/га. Контролем служил вариант без обработки. ЖОУ «Фишлизат» перед использованием нейтрализовали до рН 6,6–7,0 добавлением пищевой соды и разводили водой в соотношении 1:149 и 1:199. Подкормку проводили ручным опрыскивателем в два срока: 7 мая — фаза выхода в трубку и 26 мая — фаза колошения. 29.04.2015 г. внесен гербицид избирательного действия Фенизан (0,2 л/га). Уборку проводили 9 июля, в фазу полной спелости ячменя комбайном «Сампо-130». Статистическую обработку опытов проводили по методике Б.А. Доспехова [9].

Результаты и обсуждение

По уровню накопления аминного азота эффективность ферментативного гидролиза вдвое выше химического (табл. 1). При автолизе внутриклеточными катепсинами черноморской кильки накапливается меньше аминного азота ($51,37 \pm 0,53\%$), чем при гидролизе бактериальными протеазами ($60,52 \pm 1,08\%$).

Поскольку растения самостоятельно не способны поглощать белки, то важным показателем биодоступности является показатель аминного азота, что указывает на большую степень деградации нативного белка шпрота, в сравнении с химическими методами. В процессе гидролиза внутриклеточными катепсинами шпрота накапливается меньше аминного азота, чем при гидролизе протеазами микробного происхождения (см. табл. 1). К преимуществам гидролиза этим ферментным препаратом следует

отнести снижение в процессе расхода соляной кислоты, так как рН смеси фарш-раствор фермента постоянно стремится к оптимальному для протосубтилина рН 6,5. При использовании автопротеолиза для поддержания оптимума рН 4,0 требуется увеличение концентрации соляной кислоты в среде с 0,06 до 0,6% в процессе гидролиза. При этом время гидролиза экзоферментами сокращается в 4 раза, по сравнению с использованием автолитического процесса.

В рыбных гидролизатах, полученных с использованием ферментного препарата «Протолад», содержание общего азота также выше (табл. 2). Следует отметить, что ферментативный гидролиз для переработки рыбного сырья экономически является более предпочтительным, поскольку энергоёмкость процесса гидролиза и коррозия оборудования из-за менее агрессивных режимов работы существенно ниже.

Таблица 1

Содержание аминного азота в гидролизатах из шпрота и мидии

Образцы гидролизатов и условия гидролиза	Средние значения содержания аминного азота, %
<i>Ферментативные:</i>	
Шпрот (Энзим «Протолад») ($t=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 6 ч, $C_{\phi}=1,0\%$)	$60,52 \pm 1,08$
Автолизат шпрота ($t=45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 ч)	$51,37 \pm 0,53$
<i>Химические:</i>	
Щелочной гидролизат шпрота	$32,39 \pm 0,71$
Щелочной гидролизат мидии	$33,56 \pm 0,82$

Примечание: C_{ϕ} – концентрация фермента, % к массе субстрата

Таблица 2

Содержание общего азота в исходном сырье и гидролизатах из гидробионтов

Образец	$m_{\text{обр.}}$, мкг	m_{N} , мкг	N, %	m_{C} , мкг	C, %
Щелочной гидролизат шпрота (3 ч)	1120	133	11,96	552	49,29
Автолизат шпрота (24 ч)	1060	111	10,47	335	31,60
Ферментативный гидролизат шпрота (протосубтилин ГХЗ, 6 ч)	940	128	13,62	467	49,68
Фарш рыбный	730	84	11,51	506	69,32
Щелочной мидийный гидролизат	1430	100,88	7,05	199,19	13,93
Щелочной мидийный гидролизат	990	69,02	6,97	136,94	13,83

Примечание: $m_{\text{обр.}}$ – масса образца, m_{N} – масса азота в образце, N – содержание общего азота, %, m_{C} – масса углерода в образце, C – содержание органического углерода, %

Биомасса обрастателей морских гидросооружений состоит в основном из моллюсков, водорослей и оболочников, содержит большое количество солей, обсеменена различными микроорганизмами. При утилизации методом гидролиза столь разнородные организмы не могут быть ферментированы одним энзиматическим препаратом [20]. Также гидролизу будет препятствовать высокое содержание разнообразных солей в среде. Поэтому предпочтительным методом для утилизации морских обрастателей стоит выбрать гидролиз в щелочной среде. Это позволяет решить три задачи одновременно: 1) провести гидролиз белка гидробионтов в отсутствие реакции с раковиной моллюсков, состоящей в основе из углекислого кальция;

2) осуществить гидролиз полисахаридов водорослей; 3) лизировать клетки микроорганизмов, делая полученный продукт безопасным для дальнейшего применения. Кроме этого, использование гидролиза морских обрастателей в щелочной среде приводит к снижению концентрации тяжелых металлов и токсичных элементов в гидролизате в 5–50 раз по сравнению с исходным сырьем [4].

Аминокислотный состав гидролизатов в значительной степени определяется природой исходного сырья (рис. 1). В рыбных гидролизатах в основном преобладают алифатические аминокислоты, метионин, глутаминовая кислота и фенилаланин, а в мидийном гидролизате — глицин, лизин, треонин и серин.

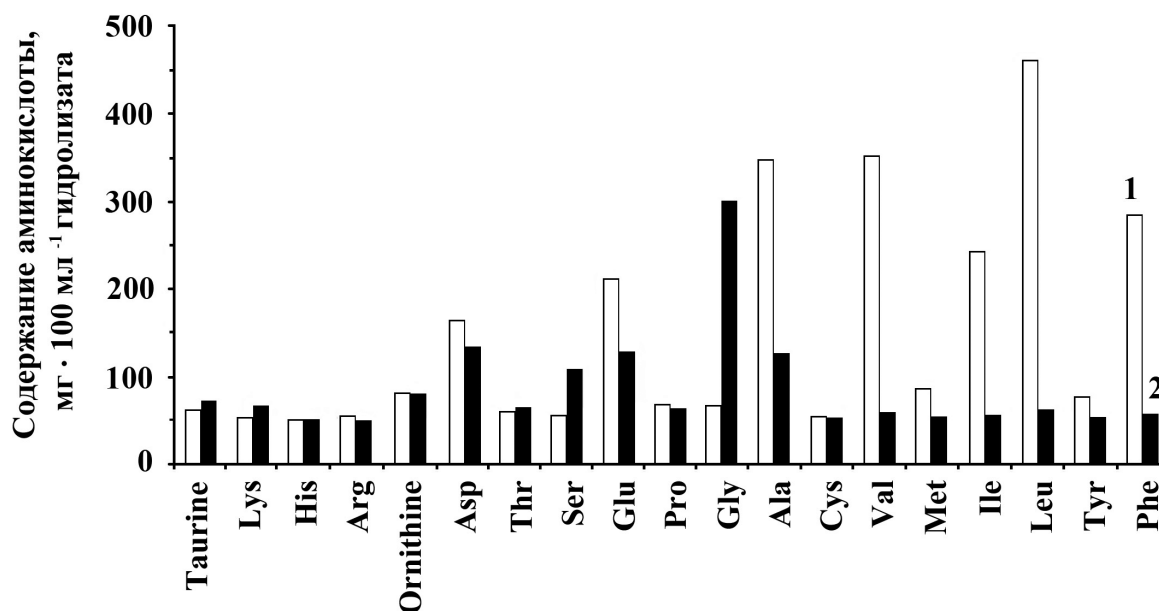


Рис. 1. Аминокислотный состав гидролизатов из различных гидробионтов: 1 — автолизат шпрота, 2 — мидийный щелочной гидролизат

Несбалансированность аминокислотного состава может быть скорректирована комбинированием гидролизатов из различных гидробионтов. Такие композиции обладают более высокими показателями аминокислотного сора и биологической ценности [2, 3]. Комбинируя гидролизаты, полученные разными методами гидролиза, можно повысить качество органического удобрения, так как сбалансированный аминокислотный состав композиции позволит полнее утилизировать аминный азот через листовую поверхность растений.

Биологическую эффективность рыбных гидролизатов оценивали по их влиянию на стимулирование роста колеоптилей пшеницы (рис. 2) и приросту веге-

тирующих листьев при однократном замачивании семян в растворе удобрения при разведении 1:99 — 1:199. Наибольшим стимулирующим действием обладает ферментативный гидролизат шпрота, полученный с использованием препарата Протолад, при максимальном разведении исходного раствора в 200 раз. На рост колеоптилей оказывает влияние не только концентрация питательных веществ в гидролизате, но и концентрация солей в среде культивирования. Так, разведение исходного раствора 1:10 для всех гидролизатов тормозит рост колеоптилей. Влияние щелочного гидролизата шпрота на рост колеоптилей пшеницы достоверно не отличалось от контроля на воде.

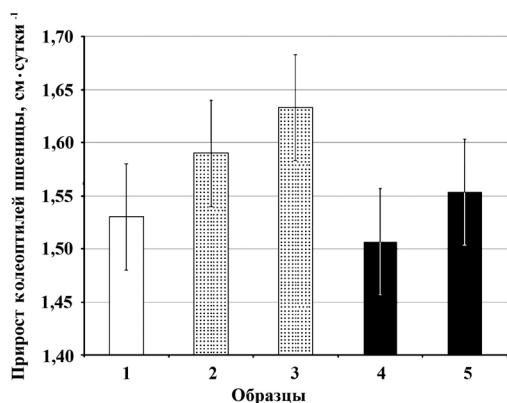


Рис. 2. Прирост coleoptилей пшеницы на питательной среде, содержащей различные гидролизаты. Контроль на воде — 1. На среде, содержащей ферментативный гидролизат шпрота: 2 — разведение 1:99; 3 — разведение 1:199. На среде, содержащей щелочной гидролизат шпрота: 4 — разведение 1:99; 5 — разведение 1:199

Для изучения биологической активности гидролизатов были изготовлены жидкие органические удобрения на основе автолизата шпрота (АШ), ферментативного гидролизата шпрота (ФГШ) и щелочного гидролизата

шпрота (ЩГШ). После проведения статистического анализа с применением критерия Стьюдента получены следующие данные по объединенной выборке из трех опытов (табл. 3).

При разведении удобрения в 10 раз зерна не прорастали и проростки не развивались. При разведении гидролизатов в 50 раз в первую неделю посева давали прирост стеблей ниже контрольных и только к концу второй недели сравнивались по длине стеблей (рис. 3). Наилучшее развитие проростков пшеницы получено при разведении удобрений в 150–200 раз. Это связано, вероятно, со снижением концентрации соли в питательной среде и изменением осмотической силы растворов. Также отмечены различия в динамике развития проростков пшеницы при использовании различных способов получения гидролизатов. Так, например, ФГШ ускорял развитие проростков в первую неделю опыта с последующим замедлением роста во вторую неделю, а при удобрении на основе автолизата шпрота, наоборот, хуже росли в первые дни, увеличивая приросты на второй неделе. Удобрение на основе щелочного гидролизата шпрота показало наименьшие приросты проростков пшеницы.

Таблица 3

Прирост проростков пшеницы после однократного замачивания семян в растворах удобрений, полученных различными способами гидролиза

Образцы гидролизатов	Объем выборки	Длина листьев, см	Дисперсия выборки	Отношение длины листьев к контролю, %
Контроль (водопроводная вода)	50	16,18±1,64	0,68	100,00
АШ, 1:99	50	16,96±2,02	1,65	102,86
ФГШ, 1:99	50	17,25±1,26	0,89	106,36
ЩГШ, 1:99	50	17,02±1,41	0,78	105,41
АШ, 1:199	50	17,74±1,73	1,22	109,95
ФГШ, 1:199	50	19,14±2,33	1,82	119,26
ЩГШ, 1:199	50	17,86±1,07	1,41	110,81

Примечание: АШ — автолизат шпрота, ФГШ — ферментативный гидролизат шпрота, ЩГШ — щелочной гидролизат шпрота

Как правило, органические удобрения, полученные из различных частей животного, содержат много питательных макро- и микроэлементов и потому могут служить полноценной заменой минеральным удобрениям синтетического происхождения. Прототипами разрабатываемой технологии являются удобрения, получаемые из малоценных и мелких видов рыб [14] методом автолиза [17]. Существенным недостатком такого удобрения является устойчивый характерный запах гниющей рыбы. Поэтому предложено новое техническое решение,

включающее в себя замену процесса автолитического расщепления белкового компонента рыбного сырья на гидролиз протеолитическими ферментными комплексами бактериального или грибкового генеза [18]. Это повысило степень расщепления белков с 50–55% до 60–70% доли азота аминокрупп и сократило длительность процесса — время гидролиза. Ранее при разработке питательных сред было показано, что, комбинируя автолизат шпрота с мидийным щелочным гидролизатом, можно значительно повысить питательные свойства сред, которые

взаимодополняют аминокислотный состав конечного продукта. Так, в проведенных испытаниях установлено, что при содержании в автолизате шпрота 14% массовой

доли щелочного мидийного гидролизата рост штаммов бактерий-продуцентов пробиотиков *Escherichia coli* M-17 в 2 раза превышал рост на эталонной среде [15].

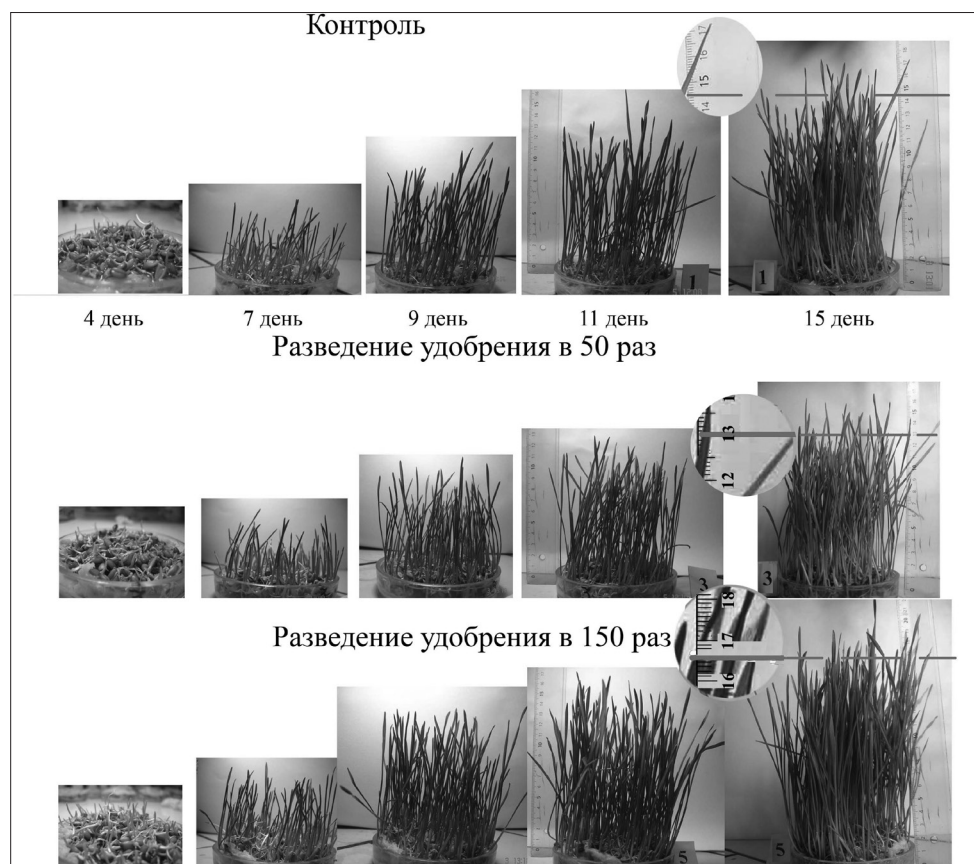


Рис. 3. Развитие проростков пшеницы из однократно стимулированных зерен пшеницы раствором жидкого органического удобрения «Фишлизат» при различном разведении. Контроль — выращивание на водопроводной воде, разведение удобрения с водой в соотношениях 1:49 и 1:149

Проведение полевого опыта по изучению влияния ЖОУ «Фишлизат» на рост и развитие ярового ячменя продемонстрировало, что удобрение не оказывало влияния на наступление основных фенологических фаз. Они отмечены одновременно во всех вариантах опыта на неделю раньше многолетних сроков и зависели от погодных условий.

Биометрический анализ снопового материала и учет урожая ярового ячменя установил положительное влияние удобрения на продуктивность колоса. Так, во всех вариантах с применением удобрений отмечена тенденция к увеличению длины колоса (от 0,2 до 1,0 см) и массы 1000 зерен (от 0,3 до 3,3 г) (табл. 4). Применение удобрения с нормой расхода 1,5 л/га в фазу колошения способствовало формированию крупного зерна с массой 1000 зерен 54,6 г, что достоверно выше контроля. Увеличение крупности зерна способствовало повышению натурной массы от 2 до 8 г, что улучшило технологические показатели качества зерна.

Учет урожайности показал, что наиболее высокие результаты получены при применении ЖОУ «Фишлизат» с нормой расхода 1,0 и 1,5 л/га. Если при применении ЖОУ в фазу трубкования отмечена только тенденция к повышению урожайности, то в фазу колошения прибавка урожая была достоверной и составила 1,9 и 2,3 ц/га соответственно (см. табл. 4). Ранее нами совместно с Институтом физиологии растений и генетики НАН Украины была разработана технология получения основы комплексных удобрений с высоким содержанием аминокислот для обработки семян культурных растений и внекорневого внесения [19]. В полевых испытаниях удобрений в течение 2010–2013 гг. установлено, что применение этих удобрений позволяло повысить урожайность озимой пшеницы сорта Смуглянка на 7–19%, а качество зерна — 5–11%. Поэтому опыты по изучению влияния удобрений на основе гидролизатов из мелкой морской рыбы и отходов рыбного промысла на урожайность и качество зерна будут продолжены.

Влияние жидкого органического удобрения «Фишлизат» на показатели продуктивности ярового ячменя, 2015 г.

№ п/п	Показатели	Контроль	Внесение ЖОУ по фазам развития, л/га						НСР ₀₅
			фаза трубкования			фаза колошения			
			0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	
1.	Длина колоса, см	6,9	7,4	7,6	7,1	7,8	7,1	7,9	1,0
2.	Количество зерен с колоса, шт	21,6	20,2	22,4	20,4	22,3	20,5	21,8	3,7
3.	Масса 1000 зерен, г	51,3	51,6	51,4	51,6	51,9	52,7	54,6	2,6
4.	Натурная масса зерна, г/л	590	592	595	598	593	593	595	30,5
5.	Урожайность, ц/га	34,5	34,5	34,6	34,8	34,6	36,4	36,8	1,6
6.	Прибавка урожая, ц/га	-	-	+0,1	+0,3	+0,1	+1,9	+2,3	-

Заключение

Показано, что ферментативные гидролизаты оказывают стимулирующее действие на рост coleoptилей пшеницы и скорость роста листовой пластинки проростков, что дает основание считать их перспективными в качестве основы для получения органических удобрений и рекомендовать к практическому применению. По результатам исследований можно сделать вывод о положительном влиянии жидкого органического удобрения из рыбного сырья «Фишлизат» на формирование урожайности ярового ячменя и озимой пшеницы. Наиболее эффективной является норма расхода ЖОУ «Фишлизат» — 1,0 и 1,5 л/га. Таким образом, удобрения с высоким содержанием аминокислот из морского сырья могут использоваться для получения экологически безопасной продукции растениеводства.

Литература

1. *Агнестикова В.Н.* Определение гибберелловой кислоты по ростовой реакции проростков // Методы определения регуляторов роста и гербицидов / Под ред. Ю.В. Ракитина. — М.: Наука, 1966. — С. 93–99.
2. *Голуб М.О.* Гідролізати з чорноморських гідробіонтів і можливості їх застосування / Автореф. дис. на здоб. наук. ступ. кандидата біологічних наук 03.00.20 — біотехнологія. — Київ, 2011. — 24 с.
3. *Голубь Н.А., Ерохин В.Е., Рябушко В.И.* Биотехнология получения продукта лечебно-профилактического назначения из двустворчатого моллюска мидии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 2. — С. 11–19.
4. *Голубь Н.А., Ерохин В.Е., Солоницына О.Р.* Исследование химического состава щелочного мидийного гидролизата // Морські біотехнічні системи. Зб. наукових статей. НДЦ ЗС України «Державний океанаріум». — 2005. — Вип. 3. — С. 23–29.
5. ГОСТ 26205-91. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Мачигина в модификации ЦИНАО.
6. ГОСТ 26808-86. Консервы из рыбы и морепродуктов. Методы определения сухих веществ. — М.: Издательство стандартов, 1994.
7. ГОСТ 7636-85. Рыба и рыбные продукты. Методы анализа, маркировка, упаковка. — М.: Стандартинформ, 2010.
8. ГОСТ Р ИСО 16634-1-2011. Продукты пищевые. Определение общего содержания азота путем сжигания по методу Дюма и расчет содержания сырого протеина. Часть 1. Масличные культуры и корма для животных. — М.: Стандартинформ, 2013.
9. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. Изд. 5-е, доп. и перераб. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
10. *Ерохин В.Е., Голуб М.О.* Спосіб одержання гідролізату з молюсків. Декларац. пат. 53327А UA, МКИ 7 A23L1/333. — № 2002043479; Заявлено 25.04.02; Опубл. 15.01.03; Приоритет 15.01.03 // Бюл. № 1.
11. *Куманцов М.И., Кузнецова Е.Н., Лапшин О.М.* Комплексный подход к организации российского рыболовства на Чёрном море / Современные проблемы науки и образования. — 2012. — 5 [Электронный ресурс] <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7189>.
12. *Лагунов Л.Л., Рехина Н.И.* О питательной ценности и использовании некоторых беспозвоночных // Рыбное хозяйство. — 1962. — 11. — С. 82–85.
13. *Максимова Е.М.* Разработка технологии утилизации белковых отходов методом ферментативного гидролиза // Вестник МГТУ. — 2006. — Т. 9. — № 5. — С. 875–879.
14. *Панчул Ю.* Использование органических удобрений в США [Электронный ресурс] <http://panchul.com/2004/03/30/organic-fertilizers/>.
15. *Пархоменко Н.А., Кисельова Т.Ф., Голуб М.О., Рябушко В.И.* Розробка технології одержання пробіотика *E. coli* М-17 на середовищі з морських гідробіонтів // Ветеринарна біотехнологія. — 2007. — Бюлетень № 10. — С. 172–181.

16. Патент РФ № 2604294. МПК C05F 1/00. Способ получения органических удобрений из черноморских рыб / Голубь Н.А., Караванцева Н.В., Рябушко В.И.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН». — № 2015136556/13; заявл. 27.08.2015; приор. 27.08.2015; опубл. 10.12.2016, Бюл. № 34.
17. Патент РФ № 2444502. МПК A23J1/04, C05F 9/00. Способ получения органического удобрения на основе остаточных продуктов переработки рыбных отходов / Пашнюк Д.А., Репик Е.Е., Симахин И.В., Шевкунова В.Л. Патентообладатель: Пашнюк Д.А., Репик Е.Е., Симахин И.В., Шевкунова В.Л.; опубл. 10.03.2012.
18. Патент РФ № 2604294. МПК C05F 1/00. Способ получения органических удобрений из черноморских рыб / Голубь Н.А., Караванцева Н.В., Рябушко В.И.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН». — № 2015136556/13; заявл. 27.08.2015; приор. 27.08.2015; опубл. 10.12.2016, Бюл. № 34.
19. Патент № 72887. U UA, МПК C05F 11/00, A01C 21/00. Спосіб підвищення врожаїв озимої пшениці та інших сільськогосподарських культур / Швартау В.В., Михальські Л.М., Рябушко В.И., Голуб М.О., Єрохін В.Є.; заявник та патентодержатель Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Інститут біології південних морів ім.О.О. Ковалевського НАН України. — № у 201203830; Заявл. 29.03.2012; Опубл. 27.08.2012. Бюл. № 16.
20. Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Давидович В.В. Получение и характеристика белковых гидролизатов с использованием ферментных препаратов различной специфичности // Изв. ТИПРО. — 1997. — Т. 120. — С. 23–31.
21. Ребров А.Н., Дорошенко Н.П. Внекорневые подкормки как способ повышения адаптивности растений винограда к песчаным почвам // Научный журнал КубГАУ. — 2010. — № 58(04) [Электронный ресурс] <http://ej.kubagro.ru/2010/04/pdf/31.pdf>.
22. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. — М.: Аграрная наука, 2000. — 296 с.
23. Sripokar P., Chaijan M., Benjakul S., Kishimura H., Klomkiao S. Enzymatic hydrolysis of starry triggerfish (*Abalistes stellaris*) muscle using liver proteinase from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) // J. Food Sci. Technol. — 2016. — Vol. 53(2). — P. 1047–1054. doi: 10.1007/s13197-015-2138-z.

USE OF FISH ENZYMATIC HYDROLYSATES AS A BASIS FOR LIQUID ORGANIC FERTILIZERS

N.A. GOLUB¹, V.I. RYABUSHKO¹, N.V. KARAVANTSEVA¹,
L.A. RADCHENKO^{1,2}, E.V. REMESLO²

¹ *Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, Sevastopol;*

² *Scientific Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol*

Protein hydrolysates from the raw material of marine genesis are obtained using enzymatic bacterial preparations of proteolytic action. The efficiency of the enzymatic hydrolysis in terms of accumulation of amine nitrogen is twice as high as that of the chemical one. When performing autolysis with intracellular cathepsins of the Black Sea sprat, $51,37 \pm 0,53\%$ of amine nitrogen is accumulated, and it increases to $60,52 \pm 1,08\%$ when using bacterial protease hydrolysis. The content of total nitrogen in fish hydrolysates is $12,02 \pm 1,60\%$, organic phosphorus is $2,48 \pm 0,12\%$, potassium is $1,55 \pm 0,06\%$, and dry matter is $13,36 \pm 2,15\%$. In fish hydrolysates, aliphatic amino acids, methionine, glutamic acid and phenylalanine predominate, whereas glycine, lysine, threonine and serine are dominant in mussel hydrolysate. The maximum stimulating effect on development of seedlings is achieved with a single soak of wheat seeds in a fertilizer solution with a dilution of 1:199. The growth of these seedlings is 10–19% more intensive compared to the control. Field tests of the liquid organic fertilizer Fishlysate on spring barley demonstrate that the highest results are obtained when applying the fertilizer with an expenditure rate of 1.0 and 1.5 t·ha⁻¹ at the booting and heading phases of growth. The harvest increase in this case is $1.9 \cdot 10^2$ and $2.3 \cdot 10^2$ kg·ha⁻¹, respectively. Biometric analysis of spring barley reveals a positive effect of the fertilizer on the productivity of ears. The increase in the ear length and mass of grains is noted in all variants of the fertilizer use. Fertilizers with a high content of amino acids from marine raw materials can be used to produce environmentally-friendly and safe crop production. Thus, the use of hydrolysates from marine raw materials conduces to increase of crop harvest and green product manufacturing.

Keywords: enzymatic hydrolysates, amino acids, fish, liquid organic fertilizer, productivity of land.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ИНВЕРТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ГИДРОЛИЗАТОВ ПОМОЛА ЗЕРНА РЖИ МИКРОМИЦЕТОМ *ASPERGILLUS NIGER*

А.А. ПРИНЦЕВА^{*1,2}, Н.Ю. ШАРОВА^{1,2}, Т.В. ВЫБОРНОВА¹, А.Р. ЮШКАУСКАЙТЕ¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок —

филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,

² НИУ ИТМО Базовая магистерская кафедра «Технологий производства пищевых микроингредиентов», Санкт-Петербург

Штаммы микромицета *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 — продуценты лимонной кислоты — могут синтезировать гидролитические ферменты при глубинном способе культивирования на гидролизатах помола зерна ржи. Целью данной работы является исследование динамики инвертазной активности при культивировании штаммов *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 на гидролизатах помола зерна ржи. Объектом исследования служили штаммы микромицета *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 — продуценты лимонной кислоты. Ферментацию проводили периодическим способом по технологии концентрированных сред. В качестве углеводного субстрата исследованы гидролизаты помола зерна ржи, источника азота — нитрат аммония. Интрацеллюлярная инвертазная активность на 120 ч биотехнологического процесса в результате ферментации гидролизатов помола зерна ржи штаммом *Aspergillus niger* Л-4 варьировала от $1,70 \pm 0,10$ ед/мг мицелиальной массы до $2,19 \pm 0,15$ ед/мг мицелиальной массы. Экстрацеллюлярная инвертазная активность в результате 120-часовой ферментации гидролизатов помола зерна ржи находилась в пределах от $0,92 \pm 0,06$ ед/см³ нативного раствора до $1,05 \pm 0,08$ ед/см³ нативного раствора. При культивировании штамма *Aspergillus niger* В-3 показатели составили — от $2,53 \pm 0,18$ до $2,67 \pm 0,21$ ед/мг и от $0,59 \pm 0,04$ до $0,66 \pm 0,05$ ед/см³ соответственно. Штаммы гриба *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 при культивировании на гидролизатах помола зерна ржи обладают способностью синтезировать ферменты с инвертазной активностью. Полученные данные могут быть применены в дальнейших исследованиях для разработки технологии получения лимонной кислоты и инвертазы в одном биотехнологическом процессе.

Ключевые слова: рожь, гидролизат, лимонная кислота, продуцент, *Aspergillus niger*, инвертазная активность.

Введение

В настоящее время для микробиологического синтеза лимонной кислоты применяют отход свеклосахарного производства — мелассу. Трудности, которые возникают при подготовке мелассы к биотехнологическому процессу, связаны с ее сложным и изменчивым химическим составом, с существенным уменьшением площадей для посадки сахарной свеклы; кроме того, для подготовки мелассы необходимо провести много различных стадий. Все эти факторы приводят к тому, что становится необходимым

поиск новых видов сырья для биотехнологического синтеза пищевых микроингредиентов. Таким сырьем является зерно злаковых культур, которое находит все большее применение в пищевой биотехнологии.

Известно, что для лабораторных исследований, направленных на получение пищевых кислот микробиологическим способом, применяют зерновое сырье, а на производстве используют отходы крупяной промышленности [16].

В настоящее время на отечественном рынке пищевых микроингредиентов ощущается недостаток ряда пищевых добавок и технологических вспомогательных средств. Существует большой спрос на ферменты, которые катализируют процесс гидролиза углеводов в кислой среде. К такому типу ферментов относится инвертаза (синонимы: β -фруктофуранозидаза, сахараза; класс гидролаз — КФ 3.2.1.26) [3]. Она широко применяется в пищевой промышленности: в кондитерском производстве [4], в хлебопечении, в ликеро-водочной и в безалкогольной промышленности. Фермент можно

© 2018 г. Принцева А.А., Шарова Н.Ю., Выборнова Т.В., Юшкаускайте А.Р.

* Автор для переписки:

Принцева Анастасия Андреевна

аспирант, мл.н.с. ВНИИПД — филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, НИУ ИТМО Базовая магистерская кафедра «Технологий производства пищевых микроингредиентов»

E-mail: djkr_yfcnz@mail.ru

использовать как антикристаллизатор при изготовлении сгущенного молока, плодово-ягодных морсов, соков, экстрактов, искусственного меда и варенья [2].

В России инвертаза не производится и ввозится из-за рубежа.

Продуцентами инвертазы могут быть такие микроорганизмы, как дрожжи, грибы, бактерии и актиномицеты. Согласно литературным источникам, за рубежом для получения промышленных препаратов инвертазы используют штаммы дрожжей [14, 15], аспергиллов и пенициллов [12]. Препараты инвертазы получают из клеток дрожжей *S. cerevisiae* или *S. carlsbergensis* путем автолиза [4].

Для того чтобы решить проблему импортозамещения, необходимо расширить сырьевую базу для биотехнологического производства. Исследованным субстратом для синтеза инвертазы является сахароза и продукты ее гидролиза — фруктоза и глюкоза [9]. Глюкоза входит в структуру сложных углеводов, в частности, крахмала. Поэтому для расширения сырьевой базы можно рассмотреть применение крахмалсодержащего сырья. Известно, что продуцент лимонной кислоты — штамм микромицета *Aspergillus niger* — при культивировании на таком субстрате синтезирует не только пищевые кислоты (лимонная и глюконовая), но и обладает повышенной способностью к синтезу ферментов гидролитического действия. Так, селекционированные в Всероссийском научно-исследовательском институте пищевых добавок (ФГБНУ ВНИИПД) штаммы вместе с основным продуктом — лимонной кислотой — продуцируют глюконовую кислоту, амилолитические ферменты и инвертазу [7, 8, 10]. Во ВНИИПД были проведены исследования со штаммами *Aspergillus niger* Л-4 и В-3. В процессе их культивирования на углеводсодержащих средах было обнаружено, что данные штаммы обладают инвертазной активностью [9]. Поэтому применение такого сырья для получения в одном биотехнологическом процессе пищевых кислот и инвертазы представляет научный и практический интерес.

Целью настоящей работы является исследование динамики инвертазной активности при культивировании штаммов гриба *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 на гидролизатах помола зерна ржи.

Материалы и методы

Объектом исследования служили штаммы микромицета *Aspergillus niger* Л-4 и В-3, селекционированные в ФГБНУ ВНИИПД для биоконверсии свекловичной мелассы и сока сорго в лимонную кислоту [8].

Ферментацию проводили периодическим способом по технологии концентрированных сред в условиях шейкера-инкубатора Multitron (INFORS, Швейцария) в колбах вместимостью 750 см³ при температуре 36±1 °С — на стадии получения посевного мицелия, при 32±1 °С — на стадии ферментации [1].

Для исследований в качестве углеводного субстрата использовали помол зерна ржи. Гидролиз помола зерна ржи проводили с применением ферментных препаратов целлюлолитического и амилолитического действия. Источником азота являлся нитрат аммония (ГОСТ 22867-77).

Состав среды для ферментации, г/дм³: углеводный субстрат — 150; нитрат аммония (NH₄NO₃) — 0,1; сульфат магния семиводный (MgSO₄·7H₂O) — 0,25; фосфат калия однозамещенный (KH₂PO₄) — 0,16; рН 6,2.

Инвертазную активность оценивали колориметрическим методом [5].

Результаты и обсуждение

В ранее проведенных исследованиях была обнаружена инвертазная активность в мицелии (интрацеллюлярная инвертазная активность) и в нативном растворе (экстрацеллюлярная инвертазная активность) при культивировании штаммов гриба *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 на среде, содержащей сахарозу и продукты ее гидролиза [9]. Такой многокомпонентный субстрат, как гидролизат крахмала, содержит в своем составе продукт гидролиза сахарозы — глюкозу. Как показали ранее проведенные исследования, компоненты гидролизата крахмала представляют собой более предпочтительные индукторы синтеза инвертазы [7]. Предположительно, гидролизаты зернового помола, который, помимо крахмальной фракции, содержит и источники азота, макро- и микроэлементов, будут более эффективны для продуктивного синтеза инвертазы. Состав гидролизатов помола зерна ржи, используемых в экспериментах, представлен в таблице 1.

Таблица 1

Состав гидролизатов помола зерна ржи

ДЕ, %	Доля углеводов в сумме сахаров в гидролизатах, %		
	глюкоза	мальтоза	декстрины
56,9±2,8	4,37±0,1	52,95±2,6	42,67±1,3
51,2±2,6	5,49±0,2	47,15±1,4	47,35±1,9

По литературным данным, активность фермента зависит от рН культуральной среды [6].

На рисунке 1 представлен график зависимости интрацеллюлярной инвертазной активности штамма *Aspergillus niger* Л-4 от времени при культивировании на гидролизатах помола зерна ржи.

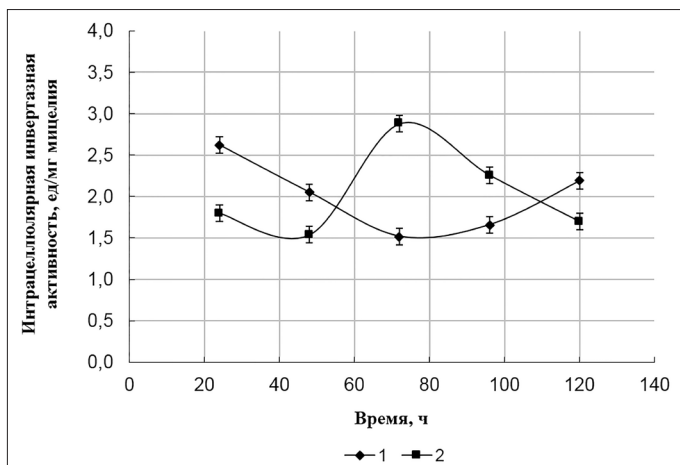


Рис. 1. Динамика интрацеллюлярной инвертазной активности при культивировании продуцента лимонной кислоты — штамма *Aspergillus niger* Л-4 — на гидролизатах помола зерна ржи (влажность мицелия 80%): 1 — ДЕ=56,9±2,8%; 2 — ДЕ=51,2±2,6%

При культивировании штамма *Aspergillus niger* Л-4 максимум инвертазной активности в мицелии приходится на 72 ч процесса культивирования. К 120 ч (к концу процесса ферментации) активность инвертазы снижается.

На рисунке 2 представлен график зависимости интрацеллюлярной инвертазной активности штамма *Aspergillus niger* В-3 от времени при культивировании на гидролизатах помола зерна ржи.

При культивировании штамма *Aspergillus niger* В-3 максимум инвертазной активности в мицелии приходится на 48 ч процесса культивирования. К 120 ч (к концу процесса ферментации) активность инвертазы снижается. Возможно, синтез инвертазы в клетке аспергилла зависит от наличия в определенный момент времени культивирования в среде субстрата — глюкозы. Так, в начале процесса культивирования микроорганизм потребляет глюкозу, находящуюся в среде. Происходит активный синтез инвертазы, которая накапливается в мицелии. Затем происходит выделение (экскреция) фермента во внеклеточное пространство (на графике наблюдается снижение активности инвертазы в мицелии).

Динамика накопления инвертазной активности в клетке для штаммов различается.

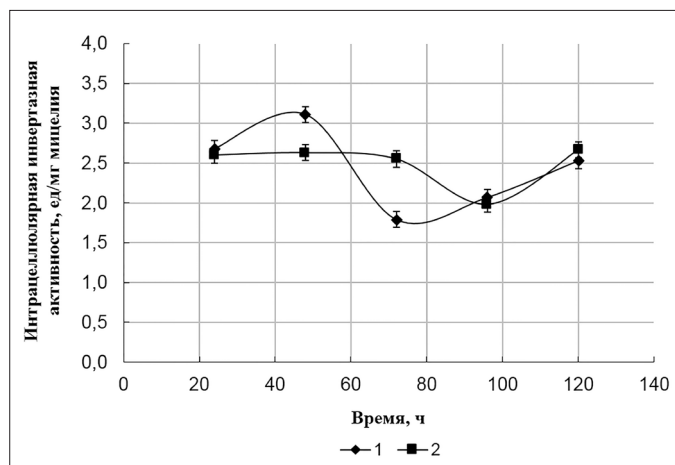


Рис. 2. Динамика интрацеллюлярной инвертазной активности при культивировании продуцента лимонной кислоты — штамма *Aspergillus niger* В-3 — на гидролизатах помола зерна ржи (влажность мицелия 80%): 1 — ДЕ=56,9±2,8%; 2 — ДЕ=51,2±2,6%

Аналогичная тенденция отмечена для экстрацеллюлярного фермента. На рисунках 3 и 4 представлены графики зависимости экстрацеллюлярной инвертазной активности штамма *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 от времени при культивировании на гидролизатах помола зерна ржи.

В проведенных опытах среди исследуемых образцов наибольший уровень экстрацеллюлярной инвертазной активности получен при ферментации гидролизата помола зерна ржи с ДЕ=56,9±2,8%. Максимальная активность фермента в нативном растворе составила 1,98±0,16 ед/см³ (рис. 3 и 4).

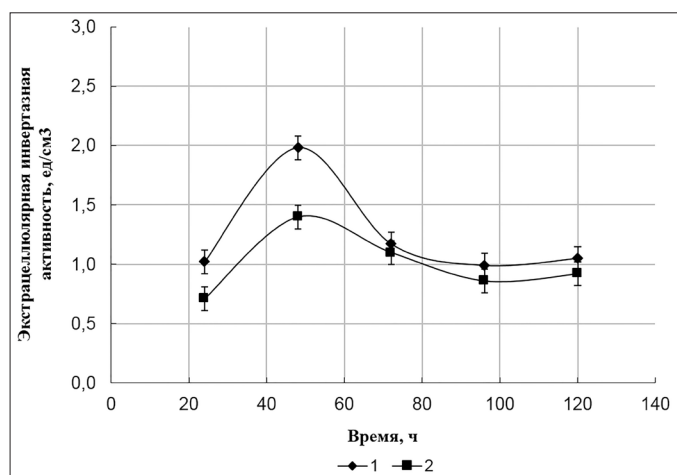


Рис. 3. Динамика экстрацеллюлярной инвертазной активности при культивировании продуцента лимонной кислоты — штамма *Aspergillus niger* Л-4 — на гидролизатах помола зерна ржи: 1 — ДЕ=56,9±2,8%; 2 — ДЕ=51,2±2,6%

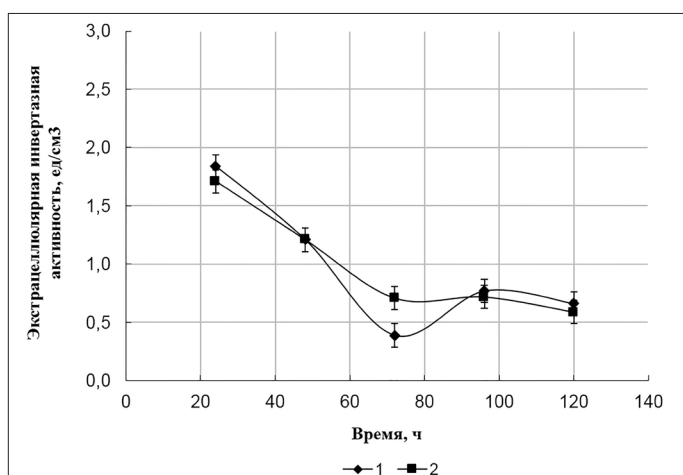


Рис. 4. Динамика экстрацеллюлярной инвертазной активности при культивировании продуцента лимонной кислоты — штамма *Aspergillus niger* В-3 — на гидролизатах помола зерна ржи: 1 — ДЕ=56,9±2,8%; 2 — ДЕ=51,2±2,6%

Для штамма Л-4 наибольшая инвертазная активность в нативном растворе (экстрацеллюлярная инвертазная активность) приходилась на 48 ч процесса развития микромицета, а для штамма В-3 — на 24 ч процесса.

В проведенных опытах среди исследуемых штаммов наибольший уровень экстрацеллюлярной инвертазной активности получен при ферментации штамма Л-4.

Инвертазная активность к 120 ч (конец биотехнологического процесса) в результате ферментации штаммов Л-4 и В-3 приведена в таблице 2.

Таблица 2

Инвертазная активность штаммов *Aspergillus niger* Л-4 и В-3 в конце процесса ферментации гидролизатов помола зерна ржи (120 ч)

Наименование	Инвертазная активность	
	экстрацеллюлярная ед/см³	интрацеллюлярная ед/мг
Штамм Л-4		
ДЕ=56,9±2,8%	1,05±0,08	2,19±0,15
ДЕ=51,2±2,6%	0,92±0,06	1,70±0,10
Штамм В-3		
ДЕ=56,9±2,8%	0,66±0,05	2,53±0,18
ДЕ=51,2±2,6%	0,59±0,04	2,67±0,21

Экстрацеллюлярная инвертазная активность в результате 120-часовой ферментации штамма *Aspergillus niger* Л-4 находилась в пределах от 0,92±0,06 до 1,05±0,08 ед/см³, для штамма *Aspergillus niger* В-3 — от 0,59±0,04 до 0,66±0,05 ед/см³.

При ферментации отходов агропроизводств (пшеничные отруби, рисовая мезга и др.) экстрацеллюлярная инвертазная активность находилась в пределах от 0,20±0,01 до 19,10±0,19 ед/см³, интрацеллюлярная активность составляла от 0,10±0,01 до 4,10±0,01 ед/см³ мицелиальной суспензии [11, 13].

По сравнению с гидролизатами крахмала выявленная активность инвертазы в конце процесса в нативном растворе в 3 раза выше.

Заключение

Экспериментальные данные, полученные в результате исследования динамики инвертазной активности в процессе ферментации гидролизатов помола зерна ржи штаммами *Aspergillus niger* Л-4 и В-3, специально селекционированными для синтеза лимонной кислоты, свидетельствуют о способности штаммов синтезировать фермент — инвертазу при культивировании на данном субстрате.

При ферментации гидролизатов помола зерна ржи штаммом Л-4 экстрацеллюлярная инвертазная активность в конце процесса выше, чем при ферментации штаммом В-3.

В России и за рубежом отсутствуют данные о получении лимонной кислоты и инвертазы в одном технологическом процессе. Таким образом, разработка «совмещенной» технологии этих микроингредиентов является актуальной и полученные данные создают основу для реализации поставленной цели. Полученные экспериментальные данные являются предпосылкой для создания технологии фермента с использованием крахмалсодержащего сырья.

Литература

1. Выборнова Т.В., Никифорова Т.А., Комов В.П., Пиотровский Л.Б., Думпис М.А., Литасова Е.В. Способ получения лимонной кислоты. Патент РФ, no. 2428481, 2011.
2. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Изд-во «Элевар», 2000. — 512 с.
3. Кулев Д.Х. Техническое регулирование пищевых ингредиентов на едином экономическом пространстве // Контроль качества продукции. — 2014. — № 8. — С. 27–35.
4. Неверова О.А., Гореликова Г.А., Позняковский В.М. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. — 416 с.

5. Рухляева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 288 с.
6. Смирнов В.А. Пищевые кислоты (лимонная, молочная, винная). — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. — 264 с.
7. Шарова Н.Ю., Выборнова Т.В., Килева А.И., Юшкаускайте А.Р. Инвертазная активность при культивировании продуцентов лимонной кислоты — штаммов *Aspergillus niger* — на мелассе и гидролизатах крахмала // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 4. — С. 16–22.
8. Шарова Н.Ю., Позднякова Т.А., Выборнова Т.В., Кулев Д.Х. Способ получения лимонной кислоты, альфа-амилазы и глюкоамилазы. Патент РФ, по. 2366712, 2009.
9. Шарова Н.Ю. Синтез инвертазы штаммами микромицета *Aspergillus niger* продуцентами лимонной кислоты // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. — 2016. — № 1(16). — С. 60–67.
10. Шарова Н.Ю. Способ получения лимонной кислоты и комплекса кислотостабильных амилолитических ферментов. Патент РФ, по. 2294371, 2007.
11. Alegre A.C.P., Moraes Polizeli M. L.T., Terenzi H.F., Jorge J.A., Guimaraes L.H.S. Production of thermostable invertase by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source // Brazilian Journal of Microbiology. — 2009. — Vol. 40. — P. 612–662.
12. Flores-Gallegos A.C., Castillo-Reyes F., Lafuente C.B., Loyola-Licea J.C., ReyesValdés M.H., Aguilar C.N., Rodríguez Herrera R. Invertase production by *Aspergillus* and *Penicillium* and equencing of an inv gene fragment // Micología Aplicada Internacional. — 2012. — Vol. 24. — No. 1. — P. 1–10.
13. Guimaraes L.H.S., Somera A.F., Terenzi H.F., Polizeli M.L.T.M., Jorge J.A. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus viveus* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose // Process Biochemistry. — 2009. — Vol. 44. — P. 237–241.
14. Haq I., Ali S., Aslam A., Qadeer M.A. Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with enhanced production of β -D-fructofuranosidase // Biores. Technol. — 2008. — Vol. 99(1). — P. 7–12.
15. Haq I., Ali S. Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates // Pak. J. Bot. — 2005. — Vol. 37(3). — P. 749–759.
16. Xie G., West T.P. Citric acid production by *Aspergillus niger* on wet corn distillers grains // Letters in Applied Microbiology. — 2006. — Vol. 43. — No. 3. — P. 269–273.

RESEARCH OF THE DYNAMICS INVERTASE ACTIVITY DURING BIOTRANSFORMATION HYDROLYSATES OF GRINDING GRAIN OF RYE BY MICROMYCETE *ASPERGILLUS NIGER*

A.A. PRINTSEVA^{1,2}, N.Yu. SHAROVA^{1,2}, T.V. VYBORNOVA¹, A.R. YUSHKAUSKAITE¹

¹ All-Russian Research Institute for Food Additives — Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS,

² Chair of Food Microingredients Processing ITMO University, St. Petersburg

The strains of micromycete *Aspergillus niger* L-4 and B-3 — the producers of citric acid can synthesize hydrolytic enzymes with a deep cultivation method on hydrolysates of grinding grain of rye. The aim of this work is a research of the dynamics invertase activity during cultivation of the strains *Aspergillus niger* L-4 and B-3 on hydrolysates of grinding grain of rye. The object of the research were the strains of micromycete *Aspergillus niger* L-4 and B-3 — the producers of citric acid. The fermentation was carried out periodic way according to the technology of concentrated environments. As a carbohydrate substrate are investigated hydrolysates of grinding grain of rye, the nitrogen source is ammonium nitrate. Intracellular invertase activity at 120 h of biotechnological process by fermentation of the hydrolysates of grinding grain of rye by the strain of *Aspergillus niger* L-4 ranged from (1,70±0,10) u/mg mycelial weight to (2,19±0,15) u/mg mycelial weight. Extracellular invertase activity as a result of 120-hour fermentation of the hydrolysates of grinding grain of rye was in the range from (0,92 ± 0,06) u/cm³ of the solution to native (1,05±0,08) u/cm³ of a native solution. When cultured a strain of *Aspergillus niger* B-3 indicators made — from (2,53±0,18) to (2,67±0,21) u/mg and from (0,59±0,04) to (0,66±0,05) u/cm³, respectively. The strains of the fungus *Aspergillus niger* L-4 and B-3 when cultured on hydrolysates of grinding grain of rye have the ability to synthesize enzymes with invertase activity. The obtained data can be applied in further researches for the development of technology for producing of citric acid and invertase in one biotechnological process.

Keywords: rye, hydrolysate, citric acid, producer, *Aspergillus niger*, invertase activity.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОДУКЦИИ СЕКРЕТИРУЕМОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ BSN *BACILLUS SUBTILIS* В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

М.А. ХАРИТОНОВА*, А.И. КОЛПАКОВ, Ф.Г. КУПРИЯНОВА-АШИНА

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

В различных лимитирующих условиях представители рода *Bacillus* активно секретируют в окружающую среду рибонуклеазы (РНКазы). Помимо стрессов, ограничивающих доступность питательных веществ, солевой стресс может активизировать продукцию секретируемых РНКаз. Установлено, что повышение концентрации солей приводит к возрастанию уровня биосинтеза РНКазы Bsn *B. subtilis*. С помощью штамма, несущего мутации в гене белка-регулятора DegU, показано, что система трансдукции сигнала DegS-DegU принимает участие в регуляции экспрессии гена и интенсификации продукции РНКазы Bsn в условиях солевого стресса.

Ключевые слова: рибонуклеаза, *Bacillus subtilis*, регуляция биосинтеза, солевой стресс.

Введение

Бактерии рода *Bacillus* подвержены существенным колебаниям концентраций солей и осмотического давления, которые происходят в результате высыхания или затопления разнообразных мест их обитания. Широко распространенный микроорганизм *B. subtilis* присутствует в засоленных почвах пустынных зон, а также обнаруживается в пресноводных реках и морских водах. Чтобы избежать негативного воздействия солевого стресса, подобно многим другим бактериям, *B. subtilis* осуществляет регуляцию внутриклеточной концентрации растворимых ионов и органических соединений, поддерживая тем самым тургор. Помимо этого, возрастание концентрации соли оказывает плейотропный эффект на физиологию *B. subtilis*, и частью многокомпонентного ответа на изменение осмотического давления является регуляция уровня синтеза секретируемых ферментов (щелочной протеазы и левансахаразы) [5]. Солевой стресс служит сигналом для интенсификации продукции низкомолекулярной гуанилспецифичной РНКазы биназы I и высокомолекулярной РНКазы биназы II *B. pumilus*. При этом регуляция экспрессии генов РНКаз реализуется посредством двухкомпонентной регуляторной системы DegS-DegU [7, 8]. Следует отметить, что и в других стрессовых условиях (дефицит источников

фосфора и азота) также происходит возрастание уровня биосинтеза секретируемых РНКаз бацилл. Контроль экспрессии генов большинства фосфат-регулируемых гуанилспецифичных РНКаз осуществляется системой сигнальной трансдукции PhoP-PhoR [10]. В регуляции экспрессии генов рибонуклеаз *B. circulans* и *B. pumilus* в условиях азотного голодания участвует белок-регулятор TtrA [4].

B. subtilis продуцирует высокомолекулярную неспецифичную РНКазу Bsn [9], которая относится ко второму типу секретируемых РНКаз рода *Bacillus*. Фермент является близким гомологом высокомолекулярной РНКазы биназы II *B. pumilus*. Структурные гены *bsn* и *birB* имеют 65% гомологии, первичные структуры белков – 72%. Для РНКаз Bsn и биназы II выявлена зависимость уровня экспрессии гена от концентрации доступных источников фосфора [2].

Целью настоящей работы стало установление молекулярных механизмов регуляции биосинтеза внеклеточной высокомолекулярной РНКазы Bsn в условиях солевого стресса.

Материалы и методы

В работе использованы следующие штаммы: *B. subtilis* 168 trpC2 (*Bacillus Genetic Stock Center*), *B. subtilis* QB4883 trpC2 amyE::(*wapA9-lacZ aphA3*) DdegU::erm, дефектный по гену белка-регулятора degU двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU [5]. Для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов РНКазы Bsn использовали плазмиду pBN104, несущую ген РНКазы и ген устой-

© 2018 г. Харитоновна М.А., Колпаков А.И., Куприянова-Ашина Ф.Г.

* Автор для переписки:

Харитоновна Майя Александровна

н.с., к.б.н., Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии

E-mail: Maya_Kharitonova@mail.ru

чивости к канамицину [9]. Выделение плазмидной ДНК и трансформацию клеток штамма-реципиента *B. subtilis* 168, не содержащего ген низкомолекулярной гуанилспецифичной РНКазы, выполняли по стандартным методикам [1].

Анализ гена РНКазы *Bsn* [AN D01097] проводили с использованием базы данных Национального центра биотехнологической информации NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и алгоритма BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Для выращивания штаммов использовали низкофосфатную пептонную среду НФПС (в %: пептон — 2,0; глюкоза — 1,0; CaCl₂ — 0,01; MgSO₄×7H₂O — 0,03; MnSO₄ — 0,01; NaCl — 0,3) и бесфосфорную синтетическую среду БФС (в %: глюкоза — 0,5; сульфат аммония — 0,2; дрожжевой экстракт — 0,5; хлорид калия — 0,5; хлорид натрия — 0,1; цитрат натрия — 0,1; сульфат магния — 0,02; трис — 0,2; рН — 8,0). Хлорид натрия (0,4 М, 0,6 М, 0,8 М, 1 М, 1,2 М, 1,4 М, 1,6 М), канамицин (10 мкг/мл) и эритромицин (10 мкг/мл) добавляли в среды в начале культивирования. Культивирование проводили при 30 °С с интенсивностью аэрации прокачиванием при 200 об/мин.

Активность РНКазы в культуральной жидкости определяли модифицированным методом Анфинсена по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза модельного субстрата — высокополимерной дрожжевой РНК [3]. Специфическую активность рибонуклеазы, которая является показателем продуктивности культуры в отношении синтеза фермента, рассчитывали как отношение общей активности фермента к величине биомассы в оптических единицах поглощения при 590 нм.

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Excel 2003. Рассчитывали среднеквадратичное отклонение (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $p \leq 0,05$ за достоверный уровень значимости.

Результаты и обсуждение

Анализ структуры промотора РНКазы *Bsn*. С целью выявления нуклеотидных последовательностей, определяющих регуляторные механизмы экспрессии гена РНКазы *Bsn*, был проведен анализ структуры промотора в сравнении с промоторами генов биназы I и биназы II *B. pumilus* (рис. 1).

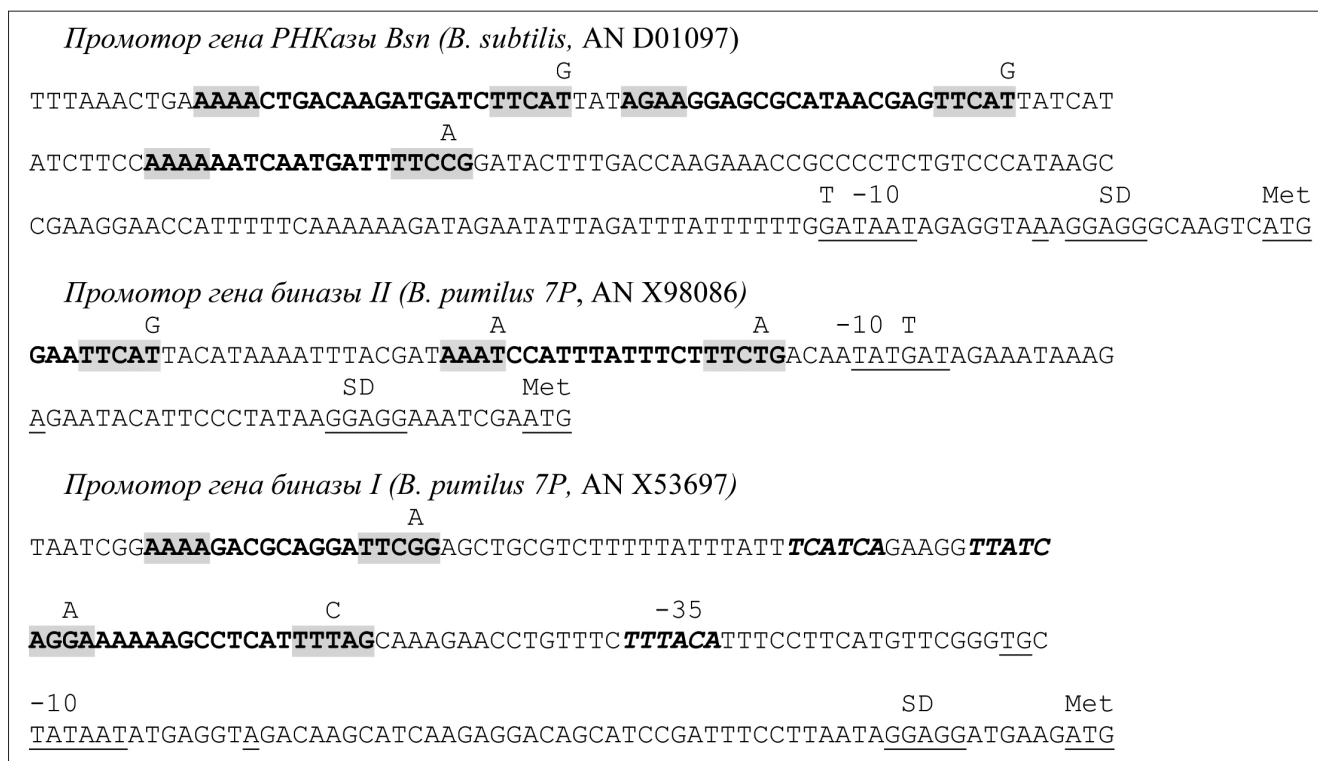


Рис. 1. Промотор гена РНКазы *Bsn* *B. subtilis* в сравнении с промоторами генов биназы II и биназы I *B. pumilus*. Сайты инициации синтеза мРНК, -10 боксы и динуклеотид TG подчеркнуты. Предполагаемые последовательности, узнаваемые регуляторным белком DegU (AG(A)AA N11-13 TTCAG), выделены жирным шрифтом, их консервативные области обведены. В промоторе гена биназы I *rho* боксы выделены жирным шрифтом и курсивом

Область, узнаваемая σ^A -фактором РНК-полимеразы в промоторах генов высокомолекулярных РНКаз Bsp и биназы II, отличается от канонической TTCaca ($N_{17\pm 1}$) TAtAAT [6]. Выраженный -35 элемент отсутствует в обоих промоторах, -10 элемент содержит 5 из 6 консенсусных нуклеотидов. Промотор гена низкомолекулярной РНКазы биназы I обладает удлиненным -10 элементом с дополнительным динуклеотидом TG и содержит близкую к канонической область для σ^A -фактора с одним отличающимся нуклеотидом в -35 элементе. Это отличие позволило ранее предположить наличие одного из четырех Rho боксов в -35 области промотора биназы I [11]. Rho боксы являются сайтами узнавания белка-регулятора RhoR, активирующего экспрессию генов большинства низкомолекулярных РНКаз бацилл в условиях фосфатного голодания. Промоторы генов фосфат-регулируемых высокомолекулярных РНКаз Rho боксов не имеют. Ранее нами было установлено, что промоторы генов биназы I и биназы II *B. pumilus* содержат сайты узнавания регуляторного белка DegU системы трансдукции сигнала DegS-DegU [7, 8]. Белок-регулятор DegU взаимодействует промоторной областью, включающей в себя два консервативных сайта, разделенных 11–13 нуклеотидами, и имеет вид AG(A)AAN_{12±1}TTCAG [5]. В промоторе гена РНКазы Bsp выявлены три потенциальных области связывания с белком DegU, гомология консервативных элементов каждой из них составила 89%. С высокой вероятностью можно предположить, что экспрессия гена РНКазы Bsp *B. subtilis*, подобно генам биназы I и биназы II *B. pumilus*, активируется системой DegS-DegU. Поскольку сенсорная киназа DegS воспринимает сигнал о возрастании концентрации соли в окружающей среде, был оценен уровень биосинтеза РНКазы Bsp в условиях солевого стресса.

Биосинтез РНКазы Bsp в условиях солевого стресса. При периодическом культивировании в стадию замедления роста и на протяжении стационарной фазы представители рода *Vacillus* активно секретируют в окружающую среду ферменты деградации, необходимые для ассимиляции труднодоступных питательных компонентов. Кроме того, изменение уровня секретируемых ферментов дополняет комплексную реакцию бактерий, направленную на выживание в гипертонических условиях [5].

Мы сравнили эффект воздействия солевого стресса на биосинтез РНКазы Bsp *B. subtilis* с данными, полученными для секретируемых РНКаз *B. pumilus*. Все исследуемые штаммы-продуценты РНКазы Bsp синтезировали внеклеточную РНКазу в соответствии

с ранее описанными общими для секретируемых низкомолекулярных и высокомолекулярных РНКаз бацилл закономерностями [2, 10]: РНКазы Bsp появлялась в культуральной жидкости на стадии замедления роста культур, максимальная активность наблюдалась к началу стационарной фазы роста.

Условия солевого стресса создавали с использованием хлорида натрия в концентрациях 0,4 М – 1,6 М. Внесение хлорида натрия в среду культивирования приводило к уменьшению количества биомассы штамма *B. subtilis* 168 (рис. 2А) и рекомбинантного штамма *B. subtilis* 168 pBN104 по мере возрастания концентрации соли (рис. 2Б). Негативный эффект солевого стресса на рост сопровождался увеличением уровня биосинтеза РНКаз как штаммом *B. subtilis* 168, так и рекомбинантным штаммом *B. subtilis* 168 pBN104. Максимальное значение продуктивности достигалось при концентрации хлорида натрия, равной 1,2 М. Продуктивность штамма *B. subtilis* 168 возросла в 3,1 раза, *B. subtilis* 168 pBN104 – в 2,5 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии адаптационных регуляторных систем выживания в условиях солевого стресса в регуляции экспрессии гена РНКазы Bsp *B. subtilis*.

Роль двухкомпонентной системы трансдукции сигнала DegS-DegU в регуляции экспрессии гена РНКазы Bsp. На основании сравнительного анализа промотора гена РНКазы Bsp и установленного эффекта солевого стресса на биосинтез РНКазы Bsp было предположено, что система трансдукции сигнала DegS-DegU регулирует экспрессию гена РНКазы Bsp *B. subtilis*.

Экспрессия гена РНКазы Bsp была изучена в штамме *B. subtilis* QB 4483, дефектном по белку-регулятору DegU. Плазмидой pBN104, несущей ген РНКазы Bsp, были трансформированы как дефектный штамм *B. subtilis* QB 4483, так и штамм *B. subtilis* 168. Наличие плазмид в трансформированных штаммах было подтверждено их последующим выделением. Интенсивность роста всех исследуемых штаммов в присутствии 1 М NaCl снижалась, однако продуктивность культур в условиях солевого стресса отличалась существенно (рис. 3). РНКазная активность штамма *B. subtilis* QB 4483 DdegU pBN104 составляла 16,7% активности полноценного штамма, как с использованием стандартной среды, так и среды с добавлением 1 М NaCl. Наличие РНКазной активности у дефектного по гену белка-регулятора DegU штамма может быть связано с тем, что регуляция экспрессии гена осуществляется посредством нескольких регуляторных механизмов.

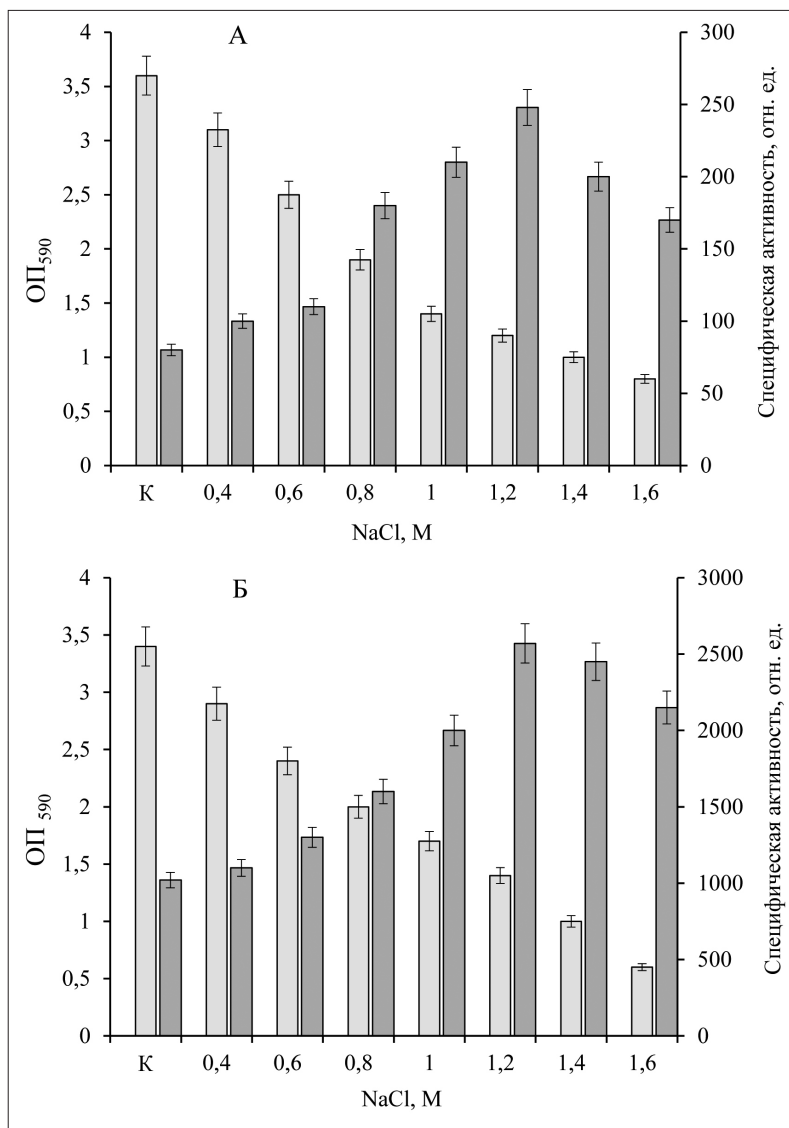


Рис. 2. Влияние солевого стресса на рост и биосинтез РНКазы Bsp штаммом дикого типа *B. subtilis* 168 (А) и рекомбинантным штаммом *B. subtilis* 168 ρBN104 (Б). К – Контрольное культивирование без внесения NaCl. Светлые столбцы – рост, темные столбцы – специфическая активность РНКазы

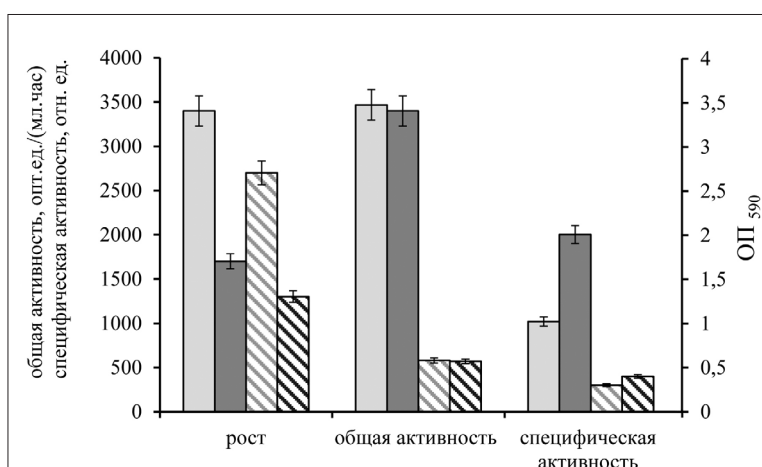


Рис. 3. Рост и биосинтез РНКазы Bsp штаммом *B. subtilis* 168 ρBN104 (сплошная заливка столбцов) и дефектным штаммом *B. subtilis* QB4483(ΔdegU) ρBN104 (диагональный рисунок столбцов) при культивировании в оптимальных условиях (светлые столбцы) и в условиях солевого стресса (темные столбцы)

При этом в дефектном штамме не происходило возрастания уровня биосинтеза РНКазы Bsn в условиях солевого стресса, в отличие от штамма с полноценной системой DegS-DegU. Продуктивность штамма *B. subtilis* QB4483 DdegU pBN104 была ниже, чем продуктивность *B. subtilis* 168 pBN104 как в оптимальных, так и в стрессовых условиях (в 3,4 и 5,1 раз соответственно).

Заключение

Таким образом, установлено, что под воздействием солевого стресса происходит интенсификация продукции секретлируемой низкомолекулярной РНКазы Bsn *B. subtilis*. Принимая во внимание полученные ранее результаты, можно заключить, что в условиях солевого стресса двухкомпонентная система трансдукции сигнала DegS-DegU осуществляет позитивный контроль экспрессии гена секретлируемой РНКазы Bsn *B. subtilis*, подобно регуляции экспрессии генов секретлируемых РНКаз *B. pumilus* (биназа I и биназа II).

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета Министерства образования и науки РФ и поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 14-14-00522).

Литература

1. Гловер Д.М. Клонирование ДНК. Методы. — М.: Мир, 1988. — 538 с.
2. Знаменская Л.В., Харитонов М.А., Каюмов А.Р., Краснов С.И. Биосинтез новых высокомолекулярных секретлируемых рибонуклеаз из *Bacillus intermedius* и *Bacillus subtilis* // Микробиология. — 2002. — Т. 71. — № 6. — С. 801–808.
3. Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Оптимизация метода определения рибонуклеазной активности с использованием высокополимерной РНК // Клиническая и лабораторная диагностика. — 1999. — № 5. — С. 14–16.
4. Харитонов М.А., Вершинина В.И. Биосинтез секретлируемых рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus circulans* в условиях азотного голодания // Микробиология. — 2009. — Т. 78. — С. 220–225.
5. Dartois V., Debarbouille M., Kunst F., Rapoport G. Characterization of a novel member of the Degs-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. — 1998. — Vol. 180. — P. 1855–1861.
6. Helmann J.D. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter // DNA Nucleic Acids Res. — 1995. — Vol. 23(13). — P. 2351–2360.
7. Kharitonova M.A., Evtugyn V.G., Kolpakov A.I. Pleiotropic effect of salt stress on motility and synthesis of secreted ribonucleases by *Bacillus pumilus* // BioNanoScience. — 2017. — Vol. 7(4). — P. 623–626.
8. Kharitonova M.A., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. Salt stress induced biosynthesis of binase II, the second *Bacillus pumilus* 7P ribonuclease with therapeutic potential // BioNanoScience. — 2017. — Vol. 7(1). — P. 148–150.
9. Nakamura A., Koide Y., Miyazaki H., Kitamura A., Masaki H., Verpu T., Uozumi T. Gene cloning and characterization of a novel extracellular ribonuclease of *Bacillus subtilis* // Eur. J. Biochem. — 1992. — Vol. 209. — P. 121–127.
10. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O., Harwood C.R. Binase-like guanyl-preferring ribonucleases are new members of *Bacillus* PhoP regulon // Microbiological Research. — 2015. — Vol. 170. — P. 131–138.
11. Znamenskaya L.V., Gabdrakhmanova L.A., Chernokalskaya E.B., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular RNases of endospore-forming bacteria // FEBS Lett. — 1995. — Vol. 357(1). — P. 16–18.

INTENSIFICATION OF THE PRODUCTION OF SECRETABLE RIBONUCLEASE BSN FROM BACILLUS SUBTILIS UNDER SALT STRESS CONDITION

M.A. KHARITONOVA, A.I. KOLPAKOV, F.G. KUPRIYANOVA-ASHINA

Kazan Federal University, Kazan

Under various limiting conditions, representatives of the genus *Bacillus* actively secrete ribonucleases (RNases) into the environment. In addition to the stresses that limit the availability of nutrients, salt stress can activate the production of secreted RNase. It was found that an increase in the salt concentration leads to an increase in the level of biosynthesis of RNase Bsn of *B. subtilis*. Using a strain bearing mutations in the gene of the DegU regulator protein, it has been shown that the signal transduction system DegS-DegU participates in the regulation of gene expression and intensifies the production of RNase Bsn under conditions of salt stress.

Keywords: ribonuclease, *Bacillus subtilis*, regulation of biosynthesis, salt stress.

СНИЖЕНИЕ ГЛУТАТИОНОМ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА В ОТНОШЕНИИ *BACILLUS SUBTILIS* SK1

Г.Ю. ЯКОВЛЕВА*, Н.В. КАЛАЧЕВА, О.Н. ИЛЬИНСКАЯ

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Токсическое действие 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) в отношении *Bacillus subtilis* SK1 складывается, по меньшей мере, из двух компонентов — токсичности ксенобиотика и (или) продуктов его трансформации, а также окислительного стресса, что проявляется в первую очередь в подавлении роста культуры. Внесение глутатиона в концентрациях до 200 мг/л не привело к существенным изменениям в динамике роста *B. subtilis* SK1 на синтетической среде без ТНТ. Высокие концентрации глутатиона (200–270 мг/л) приводили к ускорению перехода клеток *B. subtilis* SK1 в фазу отмирания. В присутствии ксенобиотика глутатион стимулировал рост *B. subtilis* SK1. Уменьшение токсического эффекта ТНТ обусловлено нейтрализацией глутатионом активных форм кислорода (АФК), образующихся на начальных этапах трансформации, а также его возможным использованием клеткой в качестве восстановителя. Глутатион стимулировал процесс трансформации ТНТ (100 мг/л); при увеличении концентрации ксенобиотика данного эффекта не наблюдали. В составе продуктов трансформации ТНТ обнаружены как продукты нитровосстановления (ПНВ), так и нитриты, причем доля ПНВ в присутствии глутатиона возрастала. Уменьшение доли нитритов среди продуктов трансформации свидетельствует о том, что глутатион не участвует в отщеплении нитрогруппы от молекулы ТНТ.

Ключевые слова: 2,4,6-тринитротолуол, трансформация, *Bacillus subtilis*, токсичность, активные формы кислорода, глутатион.

Введение

В современном мире решение конфликтов военным путем актуализирует проблему микробной деструкции трудно разлагаемого нитроароматического соединения 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ, тротил), накапливающегося в объектах окружающей среды [10]. Хотя пути трансформации ТНТ различными микроорганизмами достаточно хорошо изучены [9], влиянию этого соединения на физиологический статус бактерий — основных деструкторов ТНТ — уделяется недостаточно внимания. Токсическое действие ТНТ в отношении бактериальных клеток проявляется в изменении морфологии и физико-химических свойств клеток, снижении трансмембранного потенциала и изменении энергетического профиля бактериальной популяции в целом [1, 2, 7, 8]. Токсичность ТНТ связана не только с присутствием в среде ксенобиотика и/или продуктов его микробной трансформации, но и с внеклеточной аккумуляцией активных форм кислорода, образующихся на

первом этапе его трансформации [3, 11]. Снижение токсичности ТНТ, необходимое для сохранения функциональной активности деструкторов, может быть осуществлено с использованием соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, например, глутатиона. Глутатион не только защищает клетку от свободных радикалов, но и определяет редокс-статус внутриклеточной среды [4, 5]. Сульфгидрильная группа глутатиона принимает участие в отщеплении нитрогруппы от ароматического кольца, что было установлено в процессе биотрансформации пентахлорнитробензола [12, 13]. Мы предположили, что экзогенный глутатион, внесенный в среду культивирования бактерий-деструкторов, может активировать процесс трансформации ТНТ за счет частичной элиминации токсических свойств самого ксенобиотика и его метаболитов.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы стала оценка влияния экзогенного глутатиона на токсичность ТНТ по отношению к широко распространенной почвенной бактерии *Bacillus subtilis* и ее способность трансформировать ксенобиотик.

Материалы и методы

Микроорганизм и условия культивирования. В работе использовали штамм *B. subtilis* SK1 из музея

© 2018 г. Яковлева Г.Ю., Калачева Н.В., Ильинская О.Н.

* **Автор для переписки:**

Яковлева Галина Юрьевна

к.б.н., доцент, Казанский (Приволжский) федеральный университет, ИФМиБ, кафедра микробиологии

E-mail: Yakovleva_Galina@mail.ru

кафедры микробиологии Казанского федерального университета (КФУ), выделенный из почв Республики Татарстан, загрязненных ТНТ. Инокулят выращивали на мясопептонном бульоне (МПБ) 16–18 ч при 30 °С и вносили в среду до конечной концентрации $3,4 \times 10^7$ кл/мл. Культивирование бактерии в условиях принудительной аэрации проводили на синтетической среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; NaCl – 0,5; глюкоза – 3,0; ТНТ – 0,1–0,2; фосфатный буфер (0,2 М KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , рН 7,0) – 4% (об/об). Восстановленный глутатион (Sigma, Германия) в концентрации, эквимолярной концентрации ТНТ (50, 100, 150 и 200 мг/л ТНТ соответствует последовательно 67,5, 135, 203 и 270 мг/л глутатиона) вносили после автоклавирования. О концентрации биомассы судили по оптической плотности, измеряемой на фотокolorиметре КФК-2-УХЛ4.2 при длине волны 670 нм.

Концентрация ТНТ и его метаболитов. Определение концентрации ТНТ и продуктов его трансформации осуществляли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Стайер-2» (Аквилон, Россия), в обращенном фазовом варианте с использованием колонки (150×4,60 мм Luna C18, Phenomenex) с детектором длин волн при 254 нм. Элюцию проводили в изократическом режиме системой растворителей ацетонитрил-вода (40:60) при скорости 1 мл/мин при комнатной температуре. Расчет проводили методом абсолютной калибровки с использованием стандартов, идентификацию соединений – по времени удерживания (мин): ТНТ – 33,1; гидроксиламино-динитротолуол (ГА) – 16,8; 2-амино-4,6-динитротолуол (2А) – 23,4; 4-амино-2,6-динитротолуол (4А) – 24,2; 2,4-диамино-6-нитротолуол (2,4 ДА) – 28,1; 2,4-динитротолуол (2,4 ДНТ) – 31–5. Общее количество продуктов нитровосстановления представляли как сумму расчетных концентраций концентрации ГА, 2А, 4А и 2,4 ДА.

Концентрация нитритов. Нитрит-ионы анализировали с помощью ионного хроматографа Thermo Scientific Dionex AS 22 (США), оснащенного градиентным насосом GP40, детектором проводимости CD20, автоматическим пробоотборником AS40, предколонкой IonPacAG9-НС (4×50 мм) и разделительной колонкой IonPacAS9-НС (4×250 мм). В качестве элюента использовали раствор состава Na_2CO_3 (4,5 мМ), NaHCO_3 (1,4 мМ). Элюцию проводили со скоростью 1,0 мл/мин. В качестве стандарта для построения калибровочных графиков использовали коммерческий раствор анионов

Thermo Scientific Dionex (США), в состав которого входили хлориды (30 мг/л), нитриты (100 мг/л), бромиды (100 мг/л), нитраты (100 мг/л), фосфаты (150 мг/л), сульфаты (150 мг/л).

Уровень АФК. АФК регистрировали на биолюцинометре БХЛ-06М (Нижний Новгород, Россия) с программным обеспечением в режиме слежения при постоянном перемешивании и температуре 25 °С. В измерительные кюветы вносили 0,5 мл суспензии клеток ($1,2 \times 10^8$ кл/мл) и 0,5 мл синтетической среды с глутатионом (0,135 мг/л) или без него, содержащей ТНТ в концентрации 100 мг/л. Интенсивность спонтанной хемилюминесценции (ХЛ) клеток измеряли в течение 900 секунд. Контролем служила синтетическая среда без ТНТ. Светосумму сигналов хемилюминесценции в течение 900 сек. (S_{900}) выражали в относительных единицах.

Статистика. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе «Origin 6.1». В работе все эксперименты были проведены не менее чем в пяти повторностях. Группу данных считали однородной, если среднее квадратическое отклонение σ в ней не превышало 11%. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Рост *B. subtilis* SK1 в присутствии глутатиона. Внесение глутатиона в концентрациях от 67,5 мг/л до 203 мг/л не привело к существенным изменениям в динамике роста *B. subtilis* SK1 на синтетической среде (рис. 1). Более высокие концентрации глутатиона (203 и 270 мг/л) приводили к достоверному снижению оптической плотности культуры. Так, уже к 24 ч бактериальная биомасса снижалась на 12,5 и 17% при концентрации глутатиона 203 и 270 мг/л, а к 48 ч – на 16,5 и 25%, соответственно. Вероятно, глутатион в этих концентрациях сам является токсичным для бактерий вследствие продукции нефизиологических концентраций АФК в клетке [6].

Рост *B. subtilis* SK1 в присутствии глутатиона на среде с ТНТ. ТНТ (100–200 мг/л) в среде культивирования вызывал подавление роста *B. subtilis* SK1 (рис. 2). Добавление глутатиона стимулировало рост бактерий, хотя на синтетической среде без ксенобиотика этот эффект не зарегистрирован.

При содержании ТНТ 100 мг/л наибольший стимулирующий эффект выявлен для концентрации глу-

татаона 135 мг/л: биомасса *B. subtilis* SK1 увеличилась примерно в 3 раза спустя 24 ч культивирования; эффект сохранился и спустя 48 ч. Концентрации глутатиона выше и та, которая ниже оптимальной, была менее эффективной: биомасса увеличилась в 2,0–2,5 раза по сравнению с вариантом с ксенобиотиком, но без глутатиона. При более высоких концентрациях ксенобиотика (150 и 200 мг/л) наибольший стимулирующий эффект также был выявлен при концентрации глутатиона 135 мг/л. При концентрации ТНТ 150 мг/л он отмечался как на 24 и 48 ч культивирования, в присутствии 200 мг/л — только на 48 ч.

инкубирования *B. subtilis* SK1, содержащей ТНТ и ТНТ с глутатионом.

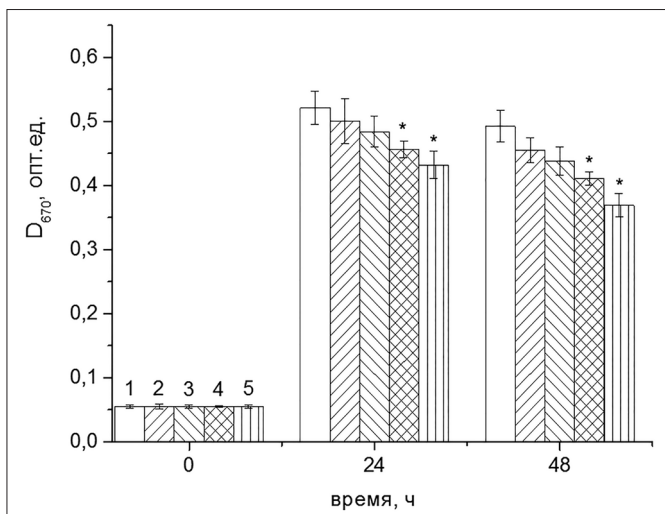


Рис. 1. Динамика роста *B. subtilis* SK1 на синтетической среде в присутствии различных концентраций глутатиона: 1 — вариант без глутатиона; глутатион (мг/л): 2 — 67,5; 3 — 135; 4 — 203; 5 — 270. На этом и последующих рисунках достоверные отличия от варианта без глутатиона ($p < 0,05$) обозначается *

Таким образом, внесение в среду культивирования глутатиона только в высоких концентрациях несколько снижало прирост биомассы *B. subtilis* SK1 на среде без ТНТ. Если в среде присутствовал ТНТ, то глутатион приводил к интенсификации роста культуры, снижая токсическое действие ксенобиотика. Следует отметить, что, несмотря на стимуляцию роста *B. subtilis* SK1 глутатионом на среде с ТНТ, прирост бактериальной биомассы не превышал таковой в варианте без ТНТ и глутатиона.

Образование активных форм кислорода в процессе трансформации ТНТ *B. subtilis* SK1. Чтобы установить, связано ли увеличение прироста биомассы с нейтрализацией АФК, которые могут образовываться на первых этапах трансформации ТНТ, методом хемотропной флуоресценции было определено их наличие в среде

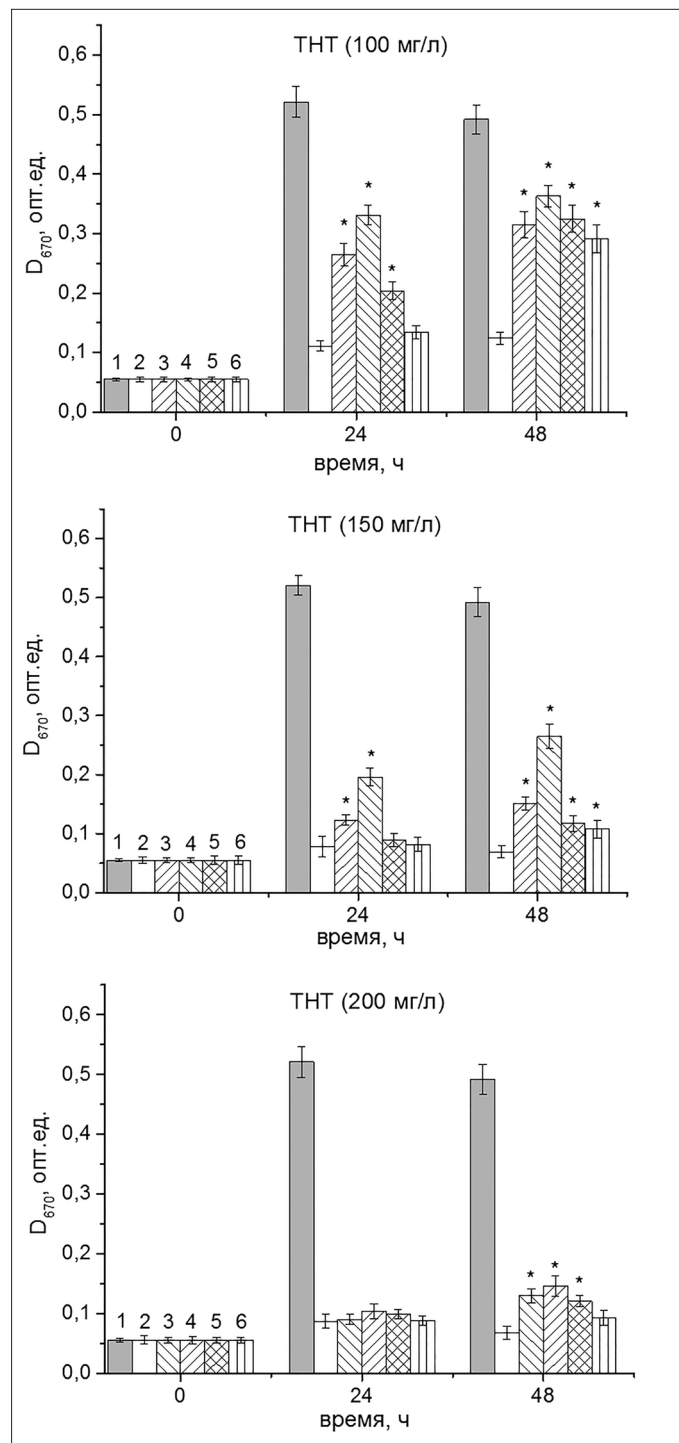


Рис. 2. Динамика роста *B. subtilis* SK1 на синтетической среде с различными концентрациями глутатиона и ТНТ: 1 — среда без глутатиона и ТНТ; 2 — среда с ТНТ без глутатиона; среда с ТНТ и глутатион: 3 — 67,5 мг/л; 4 — 135 мг/л; 5 — 203 мг/л; 6 — 270 мг/л

В процессе инкубации *B. subtilis* SK1 на среде с концентрацией ксенобиотика 100 мг/л культура

полностью трансформировала ксенобиотик с образованием моно-динитротолуолов за 1,5 ч. Образование моно-динитротолуолов дает основание предположить наличие в реакционной смеси АФК. При хемолуминесцентном анализе в реакционной смеси с ТНТ детектировали образование АФК на протяжении всего времени инкубирования *B. subtilis* SK1 (рис. 3). Внесение глутатиона в эквимолярной ТНТ концентрации (135 мг/л) снизило суммарный уровень сигнала в 3 раза, что свидетельствует о его взаимодействии с АФК и, как следствие, уменьшении окислительного стресса, вызванного ксенобиотиком.

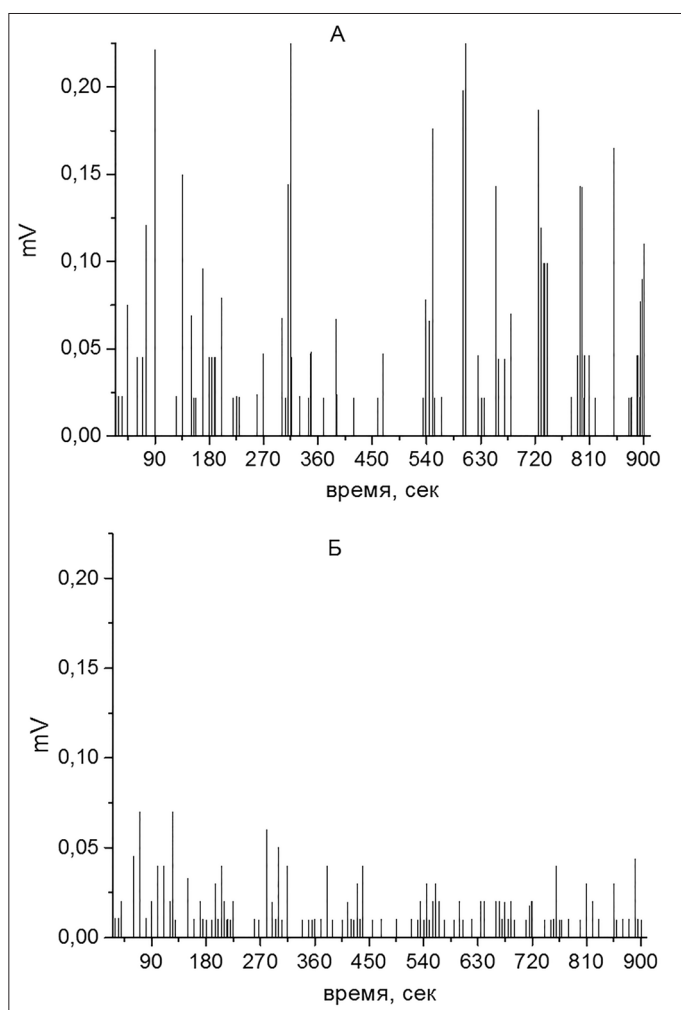


Рис. 3. Образование активных форм кислорода в реакционных смесях, содержащих ТНТ (100 мг/л): А — среда без глутатиона; Б — глутатион 135 мг/л. На рисунке представлены средние значения величин S_{900} пяти экспериментов

Влияние глутатиона на трансформацию ТНТ B. subtilis SK1. Ранее было показано, что *B. subtilis* SK1 не способен полностью трансформировать высо-

кие концентрации ТНТ (100–200 мг/л) [1]. На 24-й час культивирования концентрация ТНТ (100, 150 и 200 мг/л) снижалась на 31, 17 и 10% и на 35, 20 и 13% на 48-й час, соответственно. Внесение глутатиона в среду культивирования оказало стимулирующий эффект на процесс трансформации ксенобиотика в концентрации 100 мг/л (рис. 4). В среднем концентрация ТНТ снизилась в 1,5–2,0 раза по сравнению с концентрацией ксенобиотика на среде без глутатиона (см. рис. 4). Уменьшение более высоких концентраций ксенобиотика (150 и 200 мг/л) в присутствии глутатиона достоверно не отличалось от контрольного (без глутатиона) варианта.

Известно, что в зависимости от концентрации ТНТ штамм *B. subtilis* SK1 способен использовать различные ферментные системы для трансформации ксенобиотика [2]. Переключение путей трансформации связано с уменьшением количества восстановленных эквивалентов и, как следствие, нарушением редокс-статуса внутриклеточной среды. Глутатион не только защищает клетку от токсичных агентов (в том числе и АФК), но и в целом определяет редокс-статус внутриклеточной среды [4, 5]. Вместе с тем нельзя исключить и возможность участия сульфгидрильных групп в отщеплении нитрогруппы от ароматического кольца нитроариллов [12, 13]. Поэтому на следующем этапе работы мы определили продукты трансформации ТНТ: продукты нитровосстановления и денитрации (по накоплению свободных нитритов) в среде культивирования.

При всех исследуемых концентрациях ТНТ в среде культивирования *B. subtilis* SK1 зарегистрированы как ПНВ, так и нитриты (рис. 5). Внесение в среду культивирования глутатиона привело к стимуляции образования ПНВ при всех исследованных концентрациях ксенобиотика.

При концентрации ТНТ 100 мг/л в 1,5–2,5 раза увеличилась концентрация ПНВ при всех исследованных концентрациях глутатиона на 24-й час и в 1,4 раза на 48-й час только при максимальной концентрации (270 мг/л). Следует отметить, что если максимальную стимуляцию процесса трансформации ТНТ (100 мг/л) зафиксировали при концентрации глутатиона 135 мг/л, то максимальное накопление ПНВ выявили при 270 мг/л. При более высоких концентрациях ксенобиотика также наблюдался стимулирующий эффект, но он в среднем не превышал 30%. Среди продуктов нитровосстановления детектировали гидроксиламино- и моноаминопроизводные ТНТ.

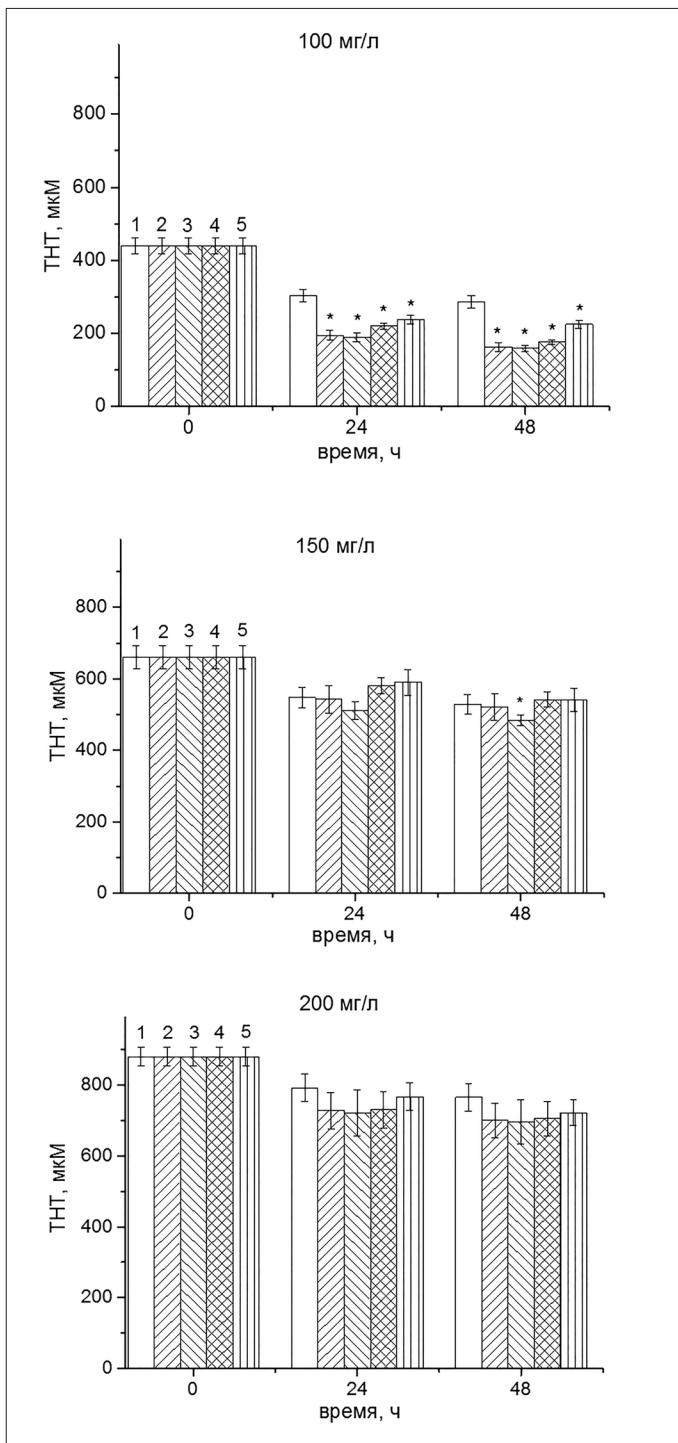


Рис. 4. Трансформация ТНТ *B. subtilis* SK1 в ростовых условиях в присутствии различных концентраций глутатиона: 1 – среда без глутатиона; глутатион: 2 – 67,5 мг/л; 3 – 135 мг/л; 4 – 203 мг/л; 5 – 270 мг/л

Параллельно с увеличением концентрации ПНВ в среде снижалась концентрация нитритов. Глутатион во всех исследованных концентрациях привел к достоверному снижению в среднем в 2,0 и 1,3 раза количества нитритов на среде, содержащей ТНТ 100 мг/л.

В присутствии ТНТ в концентрации 150 и 200 мг/л достоверное снижение количества нитритов отмечали при всех исследованных концентрациях глутатиона лишь на 24-й час; к 48-му часу их количество возрастало, а при концентрации ТНТ 200 мг/л превышало в 1,3 раза количество нитритов в варианте без глутатиона.

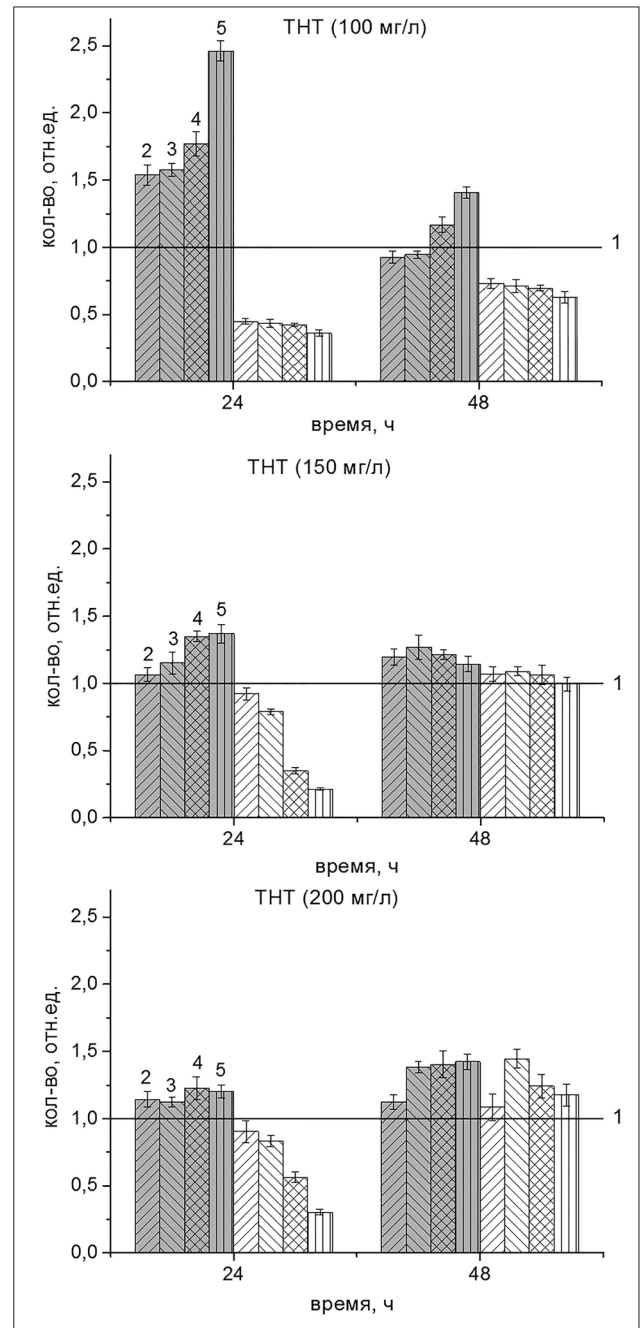


Рис. 5. Продукты трансформации ТНТ (серый цвет – ПНВ; белый цвет – нитриты) *B. subtilis* SK1 в ростовых условиях в присутствии различных концентраций глутатиона: 1 – среда без глутатиона; глутатион: 2 – 67,5 мг/л; 3 – 135 мг/л; 4 – 203 мг/л; 5 – 270 мг/л. За 1 отн. ед. принимали концентрацию продуктов трансформации ТНТ в варианте без глутатиона

Исходя из вышеизложенных данных, следует, что внесенный в среду восстановленный глутатион не участвует в процессе элиминации нитрогруппы, а, снимая токсический эффект ТНТ, приводит к использованию клеткой ферментных систем, ответственных за восстановительный этап трансформации ксенобиотика. Учитывая тот факт, что более высокие концентрации глутатиона (203 и 270 мг/л) вызывают большой стимулирующий эффект образования ПНВ при концентрации ТНТ 100 и 150 мг/л, можно предположить, что клетка может использовать его в качестве дополнительного донора водорода.

Таким образом, внесение в среду культивирования глутатиона приводит не только к стимуляции роста культуры в присутствии 100 мг/л ТНТ, но и к преимущественному использованию системы редукции для детоксикации ксенобиотика, о чем свидетельствует более высокая концентрация ПНВ при незначительном уровне нитритов в среде культивирования. При концентрации 200 мг/л токсический эффект ТНТ более выражен. Хотя количество ПНВ выше, чем в варианте без глутатиона, клетки параллельно с восстановлением нитрогрупп ведут их элиминацию.

Заключение

На основе проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- Внесение в среду культивирования *Bacillus subtilis* SK1 глутатиона в концентрации от 67,5 мг/л до 270 мг/л существенно не изменило динамику роста культуры. Концентрации 203 и 270 мг/л ускоряли процесс отмирания клеток.
- Внесение глутатиона в синтетическую среду, содержащую 2,4,6-тринитротолуол (100–200 мг/л), стимулировало рост *Bacillus subtilis* SK1. Максимальный стимулирующий эффект наблюдался при концентрации глутатиона 135 мг/л.
- Методом хемолуминесценции показано образование активных форм кислорода на ранних этапах трансформации 2,4,6-тринитротолуола и их снижение в присутствии глутатиона.
- Все исследуемые концентрации глутатиона стимулировали процесс трансформации 2,4,6-тринитротолуола (100 мг/л) штаммом *Bacillus subtilis* SK1. При концентрации ксенобиотика 150 и 200 мг/л глутатион не оказывал влияния на этот процесс.
- В присутствии глутатиона количество продуктов нитровосстановления превышало их количество

в варианте без него на протяжении всего времени культивирования. Количество нитритов снижалось по сравнению с контролем на 24-й час культивирования при всех исследованных концентрациях 2,4,6-тринитротолуола и на 48-й час — при 100 мг/л ксенобиотика.

Снижение токсического действия ТНТ вероятнее всего связано с нейтрализацией активных форм кислорода, которые могут образовываться на первых этапах трансформации ТНТ. Поскольку известно, что высокие концентрации ТНТ приводят к снижению уровня восстановленных эквивалентов [2], глутатион может также выступать как дополнительный донор водорода, участвующего в процессе восстановления нитрогрупп ароматического кольца.

Литература

1. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Влияние токсических концентраций 2,4,6-тринитротолуола на физические свойства и морфологию клеток *Bacillus subtilis* SK1 // Прикл. биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39(3). — С. 313–317.
2. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Особенности токсического эффекта 2,4,6-тринитротолуола в отношении *Bacillus subtilis* SK1 // Прикл. биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39(2). — С. 194–198.
3. Науменко Е.А., Наумов А.В., Суворова Е.С., Герлах Р., Зиганшин А.М., Ложкин А.П., Силкин Н.И., Наумова Р.П. Участие кислорода в бактериальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола // Биохимия. — 2008. — Т. 73(4). — С. 463–469.
4. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Изменения редокс-потенциала в культурах бактерий при стрессах // Микробиология. — 2012. — Т. 81(2). — С. 147–158.
5. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. — 2007. — Т. 72(2). — С. 158–174.
6. Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Глутатион у бактерий // Биохимия. — 2005. — Т. 70(11). — С. 1459–1473.
7. Черепнев Г.В., Велижинская Т.А., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Куриненко Б.М. Оценка токсического действия 2,4,6-тринитротолуола на клетки *Escherichia coli* K12 методом проточной цитофлуориметрии // Микробиология. — 2007. — Т. 76 (3). — С. 1–6.
8. Яковлева Г.Ю., Захарова Н.Г., Давыдов Р.Э., Куриненко Б.М. Подавление 2,4,6-тринитротолуолом спорообразования *Bacillus subtilis* SK1 и переход в некультивируемое состояние // Ученые записки Казанского университета. — 2013. — Т. 155. — С. 90–98.

9. *Esteve-Nuñez A., Caballero Ramos J.L.* Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2001. – Vol. 65. – P. 333–335
10. *Khan M.I., Lee J., Yoo K., Kim S., Park J.* Improved TNT detoxification by starch addition in a nitrogen-fixing *Methylophilus*-dominant aerobic microbial consortium // *Journal of Hazardous Materials.* – 2015. – Vol. 300. – P. 873–881.
11. *Kumagai, Y., Kikushima M., Nakai Y., Shimojo N., Kunimoto M.* Nitric oxide synthase (nNOS) catalyzes one-electron reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, resulting in decreased nitric oxide production and increased nNOS gene expression: implication for oxidative stress // *Free Radicals Biology & Medicine.* – 2004. – Vol. 37(3). – P. 350–357.
12. *Murphy S.E., Drotar A., Fall R.* Biotransformation of the fungicide pentachloronitrobenzene by *Tetranymena thermophila* // *Chemosphere.* – 1982. – Vol. 11(1). – P. 33–39.
13. *Renner G., Nguyen Phuc-Trung.* Mechanisms of the reductive denitration of pentachloronitrobenzene (PCNB) and the reductive dechlorination of hexachlorobenzene (HCB) // *Xenobiotica.* – 1984. – Vol. 14(9). – P. 705–710.

GLUTATHIONE REDUCTION IN THE TOXIC EFFECT OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE ON *BACILLUS SUBTILIS* SK1

G.Yu. YAKOVLEVA, N.V. KALACHEVA, O.N. ILINSKAYA

Kazan (Volga-Region) Federal University, Kazan

The toxic effect of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) on *Bacillus subtilis* SK1 is composed of at least two components – toxicity of xenobiotic and/or of its transformation products, as well as oxidative stress primarily shown in the suppression of culture growth. The addition of glutathione in concentrations up to 200 mg/l did not lead to significant changes in *B. subtilis* SK1 growth dynamics in a synthetic medium without TNT. High concentrations of glutathione (200–270 mg/l) led to acceleration of *B. subtilis* SK1 cells' transition to extinction phase. In the presence of xenobiotic, glutathione stimulated growth of *B. subtilis* SK1. The reduction of TNT's toxic effect is conditioned by glutathione-mediated neutralization of reactive oxygen species (ROS), which are formed at the initial stages of transformation, as well as its possible use as a reducing agent by the cell. Glutathione stimulated the process of TNT's transformation (100 mg/l); with increase of xenobiotic concentration, this effect was not observed. In the composition of transformation products of TNT, both products of nitro group reduction and nitrites were detected, moreover, the proportion of products of nitro group reduction in the presence of glutathione increased. The decrease of nitrites' proportion among transformation products indicates that glutathione does not participate in nitro group elimination from TNT molecule.

Keywords: 2,4,6-trinitrotoluene, transformation, *Bacillus subtilis*, toxicity, active forms of oxygen, glutathione.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА КОСТНОЙ ТКАНИ ПРЕПАРАТОМ СОЯФЛАН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

Ю.В. БЕРЕСНЕВА*, Ф.А. ИБРАГИМОВ, Н.Л. ВЫПОВА

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

В Институте биоорганической химии АН РУз получена стандартизированная комбинация полипептидов из соевой муки с молекулярной массой 12,5–79,0 кДа, богатой изофлавонами (содержание дайдзеина на грамм белка составляет в среднем 1,0–1,3 мг, генистеина – 2,0–2,45 мг). Препарат назван Сояфлан. На модели экспериментального остеопороза выявлены изменения концентрации кальция, фосфора, магния в крови и костной ткани у самок белых беспородных крыс при введении препарата Сояфлан в сравнении с препаратами Климасан и Активный кальций А.А.С. Препарат Сояфлан показал высокую эффективность предотвращения остеопороза, сопоставимую с применяемым в медицинской практике БАДом – Активный кальций А.А.С.

Ключевые слова: белковый комплекс, фитоэстрогены, изофлавоны, остеопороз.

Введение

Резкое снижение уровня эстрогенов является главной причиной ускоренного развития атеросклероза и сердечно-сосудистой патологии в целом у женщин в менопаузе [12]. Также известен высокий риск развития остеопороза у женщин в данный период. Это объясняется возрастным снижением концентрации эстрогенов, которые необходимы для поддержания плотности костной ткани в женском организме. Для решения обсуждаемой проблемы применяют синтетические препараты женских половых гормонов, которые вызывают различные побочные эффекты и могут оказывать эстрогеноподобное действие (за счет блокады физиологического влияния паратгормона – подавлять активность остеокластов, ответственных за резорбцию костной ткани; стимулировать секрецию кальцитонина, синтез коллагена в костной ткани, активность остеобластов, необходимых для костеобразования).

Фитоэстрогены не имеют побочных эффектов в отличие от синтетических эстрогенов. Фитоэстрогены способны блокировать гиперплазию эпителия молочных желез, уменьшая риск развития злокачественных новообразований [11]. Генистеин

имеет тесную связь с противораковым эффектом изофлавонов сои, проявляя антипролиферативную и антиоксидантную активность [13]. В настоящее время изучаются возможности использования соевых изофлавонов в качестве альтернативы гормональной заместительной терапии [9].

В Институте биоорганической химии АН РУз получена стандартизированная комбинация полипептидов из соевой муки, богатая изофлавонами из соевой муки сорта Генетик-1 (выведенного в Институте генетики и экспериментальной биологии АН РУз).

Цель настоящего исследования – изучение влияния белкового комплекса, богатого изофлавонами, на экспериментальный остеопороз у кастрированных самок крыс.

Материалы и методы

Электрофорез белков. Компонентный состав препарата проверяли методом электрофореза по Laemmli U.K. [10].

Изофокусирование белков. Изофокусирование белков проводили по методу Остермана Л.А. с некоторыми модификациями в 7,5% ПААГ (Т=7,5; С=3,0) в присутствии 8 М мочевины [5].

Определение изофлавонов. Количественное определение изофлавонов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью использования чистых стандартов (генистеина и дайдзеина) Sigma.

© 2018 г. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Выпова Н.Л.

* Автор для переписки:

Береснева Юлиана Викторовна

к.б.н., ст.н.с. лаборатории биорегуляторов Института биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз

E-mail: yuliana70@mail.ru

Экстрагированные изофлавоны определяли с помощью ВЭЖХ, используя колонку ВЭЖХ Agilent Technologies-1200 (С18 4,6×150 mm) и растворителя 88% метанола, 10% воды и 2% ледяной уксусной кислоты при скорости потока, равной 0,4 мл/мин. Подготовка опытных образцов проводится согласно стандартам. Объем нанесения на колонку образцов изофлавонов 1 мкл для опытных образцов 10 мкл. Количественную оценку изофлавонов в опытных образцах рассчитывали по времени выхода и концентрации чистых стандартных образцов на основании площади пиков.

Модель остеопороза. Остеопороз у животных вызывали путем кастрации белых беспородных крыс-самок массой тела более 200 г. Кастрацию проводили под легким эфирным наркозом [6].

В опыт было взято 40 белых беспородных самок крыс с начальной массой тела 200–250 г по 10 животных в группе (4 группы). В качестве препаратов сравнения служили препараты, используемые в медицинской практике: Климасан (производитель ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг», Россия, г. Москва, серия 7841014-3) и Активный кальций А.А.С. (производитель ООО «ACTIVE ASIA GOLD», Узбекистан, г. Ташкент, серия 801115).

Препараты начинали вводить через 2 месяца после кастрации перорально в дозах: Сояфлан — 40 мг/кг, Активный кальций А.А.С. — 4 мл/кг и Климасан — 43 мг/кг. Дозы рассчитаны согласно требованиям по доклиническому изучению новых фармакологических веществ [1]. Исследуемые препараты вводили с 9-й по 20-ю неделю.

О развитии остеопороза судили по изменению содержания в крови кальция, фосфора и магния через два месяца после кастрации и в динамике через 1, 2, 3 месяца после начала введения исследуемых препаратов. Для этого через каждый месяц с момента введения препаратов отбирали кровь из конъюнктивы с помощью капилляра для исследования содержания элементов Са, Р и Mg. По окончании опыта животных забивали, бедренные кости очищали, взвешивали, фотографировали и определяли в них содержание кальция, фосфора и магния.

Количественное определение элементов Са, Р и Mg в крови и костях экспериментальных животных проведено на оптико-эмиссионном спектрофотометре Perkin-Elmer Optima-2100DV (США).

Для обработки массива цифровых данных применялась стандартная компьютерная программа «Microsoft Office Excel». Обработку полученных результатов про-

водили с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [4].

Результаты и обсуждение

По данным гель-электрофореза был получен комплекс белков с молекулярной массой 12,5–79,0 кДа (рис. 1).

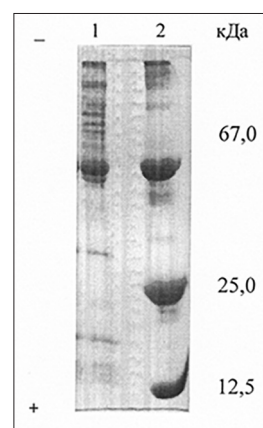


Рис. 1. Электрофорез в 10% ПААГ в присутствии ДСН: 1 — субстанции Сояфлан; 2 — смесь белков-маркеров (БСА — 67 кДа, Химотрипсиноген — 25 кДа, Цитохром С — 12,5 кДа)

Изоэлектрофокусирование белковой фракции показало наличие четырех изоточек в области рI — 4,2, 4,3, 4,5 и 4,7 (рис. 2).

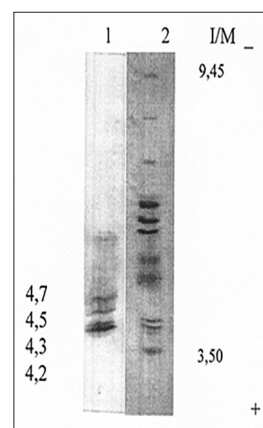


Рис. 2. Изоэлектрофокусирование субстанции Сояфлан (амфолины в диапазоне рН 3,5–10): 1 — субстанции Сояфлан; 2 — свидетели изофокусирования

Содержание дайдзеина на грамм белка составляет 1,0–1,3 мг, генистеина — 2,0–2,45 мг (рис. 3).

Белковый комплекс, обогащенный изофлавонами, назван — препарат Сояфлан. Ранее нами были получены результаты по противоопухолевой активности препарата

Сояфлан на штамме Саркома 180. Терапевтическая доза при введении *per os* составила 75 мг/кг [2]. Лечебный эффект препарата Сояфлан сопоставим с цитостатиком 5-фторурацилом (доза 228 мг/кг). Сояфлан, вводимый в монорежиме, вызывает торможение роста опухоли (ТРО): Саркома 180 до 71,0% по массе и до 78,2% по объему, а 5-фторурацил, вводимый в монорежиме, — 74,2% по

массе и 71,0% по объему. Комплексное введение 5-фторурацила и Сояфлана увеличивало значение показателя ТРО на 22–26%; в итоге при данном режиме терапии ТРО составило 92,7% по массе и 96,9% по объему [3]. Из литературы известен положительный эффект изофлавонов сои на симптомы менопаузы [11, 13], в связи с чем мы исследовали влияние препарата Сояфлан на остеопороз.

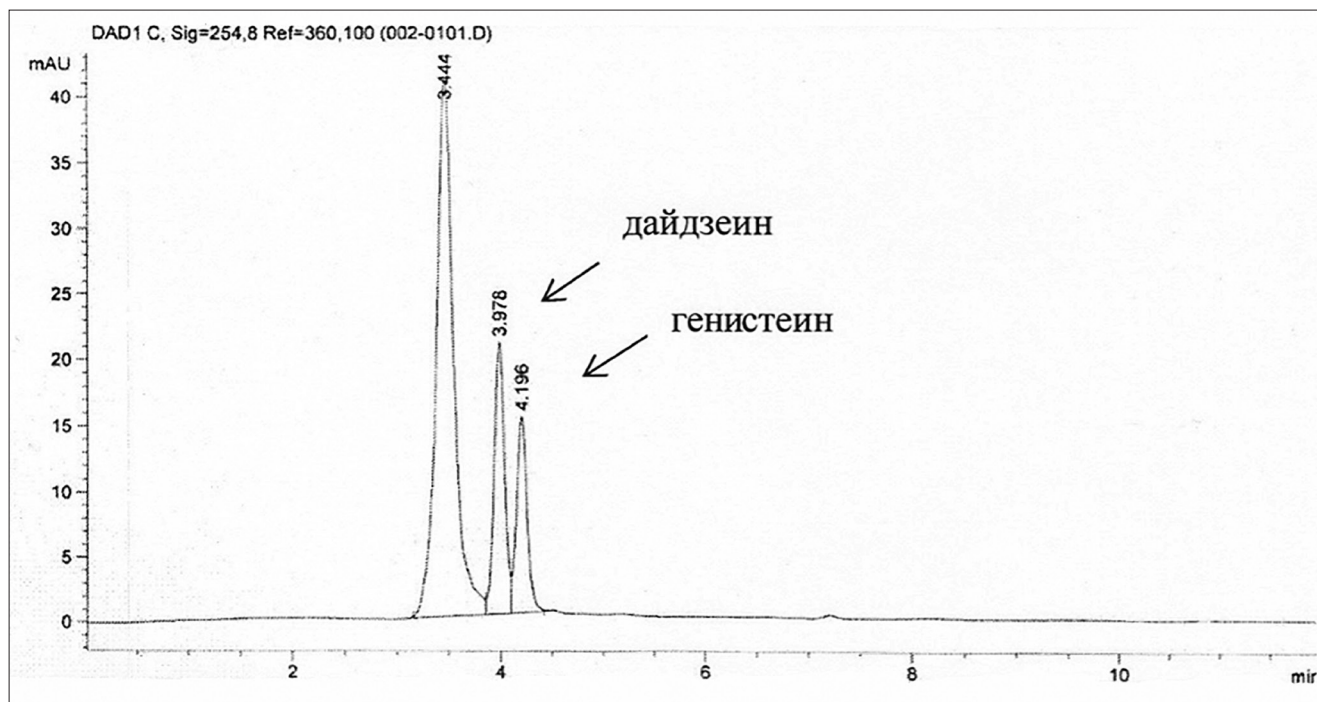


Рис. 3. Хроматографическое разделение на колонке ВЭЖХ Agilent Technologies-1200 (C18 4,6×150 mm). Образец препарата Сояфлан

Кастрация крыс приводит к развитию остеопороза, который сопровождается изменением следующих показателей: увеличение уровня фосфора, кальция и магния в крови и снижение в костной ткани.

По результатам исследования, максимальное увеличение содержания кальция, фосфора и магния в крови у контрольной группы животных наблюдалось на 90–120-е сутки. В контрольной группе по отношению к интактным животным содержание кальция увеличилось в среднем на 30%, фосфора — на 80%, магния — на 40% (табл. 1, 2).

На 150-е сутки показатели содержания кальция и фосфора в крови контрольных животных снижались в 2 раза и были увеличены на 15 и 35% по отношению к интактным животным соответственно. Вымывание магния продолжается, и его концентрация в крови контрольных животных выше на 41%, чем у интактных (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о развитии остеопороза в костной ткани кастрированных животных.

Таблица 1

Концентрации кальция, фосфора, магния в крови у самок белых беспородных крыс на модели экспериментального остеопороза через 90 дней после введения препаратов

Группы животных	Ca, мМоль/л	P, мМоль/л	Mg, мМоль/л
Интактные	2,30±0,20	1,30±0,14	0,85±0,09
Контроль (кастрация)	2,89±0,20*	2,30±0,15*	1,09±0,02*
Сояфлан (кастрация)	2,54±0,12*#	1,90±0,26*#	0,90±0,04#
Активный Са (кастрация)	2,66±0,14*#	2,15±0,14*#	0,95±0,02*#
Климаксан (кастрация)	2,74±0,12*#	1,83±0,18*#	0,90±0,04#

Примечание: * — в сравнении с интактными животными, # — в сравнении с контролем (кастрация)

Таблица 2

Концентрации кальция, фосфора, магния в крови у самок белых беспородных крыс на модели экспериментального остеопороза через 120 дней после введения препаратов

Группы животных	Ca, мМоль/л	P, мМоль/л	Mg, мМоль/л
Интактные	2,34±0,05	1,28±0,026	0,87±0,05
Контроль (кастрация)	3,0±0,19*	2,32±0,045*	1,23±0,14*
Сояфлан (кастрация)	2,51±0,26#	1,70±0,27*#	1,03±0,023*#
Активный Са (кастрация)	2,60±0,23#	2,03±0,058*#	1,07±0,023*#
Климаксан (кастрация)	2,50±0,3#	1,66±0,10*#	1,12±0,06*

Примечание: * — в сравнении с интактными животными, # — в сравнении с контролем (кастрация)

У всех тестируемых препаратов наблюдалась тенденция к снижению вымывания кальция и фосфора из костной ткани. Под действием препаратов на 90-е сутки концентрация кальция в крови животных экспериментальных групп снижалась на 8–10%, фосфора — на 7–20%, магния — на 13–18% по отношению к контролю, а по отношению к интактным животным концентрация кальция была выше на 10–19%, фосфора — на 40–65%, магния — на 5–11% (см. табл. 1). На 120-е сутки под действием препаратов концентрация кальция в крови снижалась на 13–16%, фосфора — на 12,5–28%, магния — на 9–19% по отношению к контролю. По отношению к интактным животным концентрация кальция была выше на 7–11%, фосфора — на 31–57%, магния — на 18–28% (см. табл. 2). На 150-е сутки процентное снижение концентрации кальция в крови по отношению к контролю составляет 8–10%, фосфора — 7–14%, магния — на 5%. По отношению к интактной группе в крови животных кальция было выше на 4–7%, фосфора — на 17–26%, магния — на 25–30% (см. табл. 3).

Как видно из данных таблицы 4, у контрольных животных на момент забоя (через 150 дней после кастрации) в костной ткани содержание кальция понизилось на 32% с 2,8±0,1 до 1,9 мМоль/г ткани, фосфора — на 42% с 2,6±0,07 до 1,5 мМоль/г ткани, магния — на 35% с 1,1 до 0,72 мМоль/г ткани. Дефицит фосфора костной ткани более выражен, чем дефицит кальция и магния. При этом в группах опытных животных данные показатели близки к интактным животным.

Таблица 3

Концентрации кальция, фосфора, магния в крови у самок белых беспородных крыс на модели экспериментального остеопороза через 150 дней после введения препаратов

Группы животных	Ca, мМоль/л	P, мМоль/л	Mg, мМоль/л
Интактные	2,27±0,038	1,28±0,032	0,84±0,085
Контроль (кастрация)	2,65±0,26*	1,73±0,042*	1,16±0,029*
Сояфлан (кастрация)	2,41±0,142*	1,59±0,052*#	1,05±0,067*#
Активный Са (кастрация)	2,43±0,171*	1,62±0,032*#	1,09±0,036*#
Климаксан (кастрация)	2,37±0,056*#	1,50±0,081*#	1,10±0,089*

Примечание: * — в сравнении с интактными животными, # — в сравнении с контролем (кастрация)

Это подтверждают данные по изменению массы костей контрольных животных по отношению к интактным, а также данные биометрических измерений бедренных костей крыс — отношение массы к диаметру их диафиза. Данные биометрического анализа свидетельствуют о статистически значимом снижении такого показателя в контрольной группе до 156,00±2,43 мг/мм по отношению к интактной — 221,42±3,12 мг/мм, что составляет ≈30%. Это говорит о разрежении плотности костной ткани (табл. 5).

Таблица 4

Концентрации кальция, фосфора, магния в костях у самок белых беспородных крыс на модели экспериментального остеопороза через 150 дней после введения препаратов

Группы животных	Ca, мМоль/г ткани	P, мМоль/г ткани	Mg, мМоль/г ткани
Интактные	2,8±0,26	2,6±0,28	1,1±0,10
Контроль (кастрация)	1,9±0,19*	1,5±0,14*	0,72±0,05*
Сояфлан (кастрация)	2,9±0,23#	2,8±0,19#	0,91±0,05*#
Активный Са (кастрация)	2,7±0,26#	2,4±0,20#	0,89±0,03*#
Климаксан (кастрация)	2,5±0,18#	2,2±0,22*#	0,87±0,04*#

Примечание: * — в сравнении с интактными животными, # — в сравнении с контролем (кастрация)

Биометрические показатели бедренных костей крыс

Группы животных	Интакт.	Контроль	Сояфлан	Активный кальций	Климаксан
Масса левой бедренной кости (ЛБК), мг, %	775±65 100	546±45* 70,5	706±65# 91,1	671±56# 86,6	547±48* 70,6
Диаметр диафиза, мм, %	3,5±0,01 100	3,5±0,01 100	4,0±0,012 115	3,9±0,015 112	3,5±0,01 100
Масса ЛБК/диаметр диафиза кости, мг/мм, %	221,42±3,12 100	156,00±2,43* 70,5	176,5±2,83*# 79,7	172,0±2,56*# 77,8	156,28±3,25* 70,6

Примечание: * — в сравнении с интактными животными, # — в сравнении с контролем (кастрация)

Исходя из данных литературы, существенное снижение концентрации фосфора негативно влияет на образование кристаллов гидроксиапатита, на фосфорилирование полифосфатзависимых ферментов, большое количество которых содержится в остеобластах; поэтому вполне вероятно их метаболическая «инертность». Снижение уровня магния — облигатного кофактора аденилатциклазы-цАМФ, которую считают основным регулятором минерализации [8], — также способствует «неэффективному» костеобразованию. Принимая же во внимание роль магния в стабилизации рибосом и регуляции пула пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, участие в комплексах $MgATP^{2-}$, его дефицит негативно влияет на анаболические процессы в костной ткани [7].

Введение препаратов Сояфлан, Активного кальция и Климаксана в течение трех месяцев предотвращало

вымывание фосфора, кальция и магния. Наиболее выраженное действие проявил препарат из сои — Сояфлан (см. табл. 4).

Биометрические показатели, приведенные в таблице 5, также свидетельствуют о восстановлении под действием препаратов Сояфлан и Активный кальций массы бедренной кости с 546 ± 45 до 706 ± 65 и 671 ± 56 соответственно или на 20,6 и 16,1%. Причем диаметр диафиза в группах животных, леченных препаратами Сояфлан и Активный кальций, был увеличен на 15 и 12% соответственно. В группах, принимавших препараты Сояфлан и Активный кальций, плотность костной ткани увеличилась по отношению к контролю на 9,2 и 7,3%.

Плотность же костной ткани у крыс, леченных препаратом Климаксан, уменьшилась почти на 30% по отношению к интактным животным и была на уровне контроля, что наглядно видно на рисунке 4.

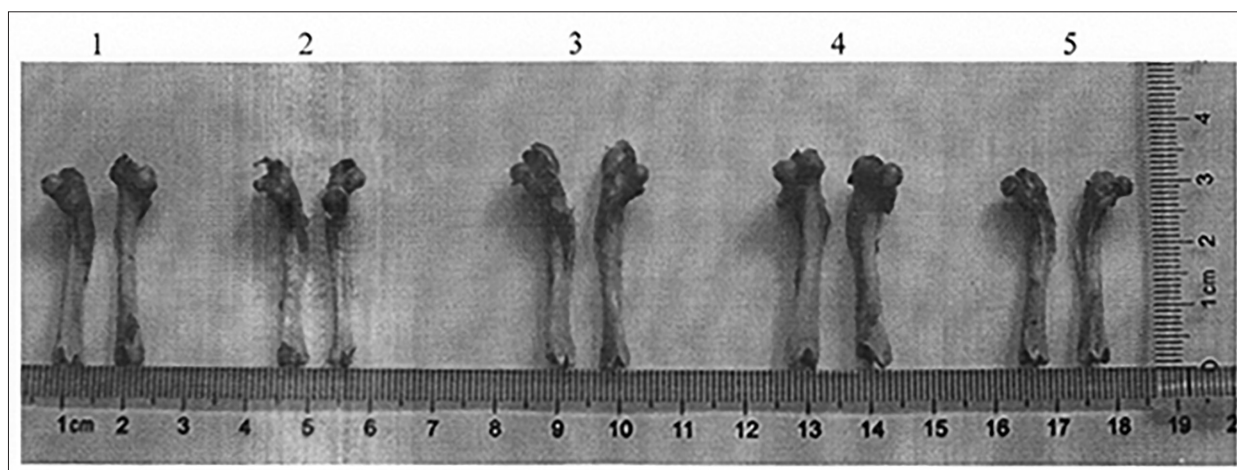


Рис. 4. Бедренные кости крыс: 1 — интактные животные; 2 — контроль; 3 — Активный Са; 4 — Сояфлан; 5 — Климаксан

Заключение

Препарат Сояфлан показал высокую эффективность предотвращения остеопороза, сопоставимую с применя-

емым в практике БАДом — Активный кальций А.А.С. Следовательно, белковый препарат, богатый изофлавонами — Сояфлан, может быть рекомендован для поддержания плотности костной ткани в период менопаузы.

Литература

1. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – С. 41–54.
2. Береснева М.В., Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Ассесорова Ю.Ю., Юсупова А.А. Оценка эффективности противоопухолевого действия соевого белка, богатого изофлавонами // *Материалы Научной конференции «Биология – наука XXI века»*. – Пушкино, 2013. – С. 397.
3. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Ассесорова Ю.Ю. Противоопухолевая и биологическая активность 5-фторурацила и соевого белка, богатого изофлавонами на поздних сроках развития опухоли // *«Интер-медикал»*. – 2014. – № 1. – С. 5–9.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: «Высшая школа», 1980. – 291 с.
5. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983. – 303 с.
6. Поворознюк В.В., Дедух Н.В., Григорьева Н.В., Гонкалова И.В. Экспериментальный остеопороз. – Киев, 2012. – 228 с.
7. Трифонова Е.Б. Роль метаболических процессов в формировании иммобилизационного остеопороза // *Фунд. исслед.* – 2011. – № 6. – С. 177–181.
8. Chek J.B., Laniko A.I. Effects of hypokinesia on cyclic nucleotides and hormonal regulation of calcium metabolism in rats // *East. Afr. Med. J.* – 2002. – Vol. 79. – No. 4. – P. 210–213.
9. de Luis D.A., Aller R., Sagrado J. Effects on health of soy in menopausal women // *Rev. Clin. Esp.* – 2006. – Vol. 206. – P. 205–207.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227(5259). – P. 680–685.
11. Rice S., Whitehead S.A. Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* – 2008. – Vol. 108. – P. 186–195.
12. Walker S.E., Register T.C., Appt S.E. et al. Plasma lipid-dependent and -independent effects of dietary soy protein and social status on atherogenesis in premenopausal monkeys: implications for postmenopausal atherosclerosis burden // *Menopause.* – 2008. – Vol. 15(4). – P. 256–263.
13. Warri A., Saarinen N.M., Makela S., Hilakivi Clarke L. The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk // *Br. J. Cancer.* – 2008. – Vol. 98. – P. 1485–1493.

CHANGE IN THE STATE OF BONE MINERAL TISSUE METABOLISM BY SOYAFLAN IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS

Yu.V. BERESNEVA, F.A. IBRAGIMOV, N.L. VYPOVA

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

A standardized combination of polypeptides from soy flour with a molecular weight of 12,5–79,0 kDa rich in isoflavones (daidzein content per gram of protein is in average 1,0–1,3 mg, genistein – 2,0–2,45 mg) was received in the Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan. The drug is called Soyaflan. On the model of experimental osteoporosis, changes in the concentration of calcium, phosphorus, magnesium in the blood and bone tissue in female white outbred rats were revealed with the administration of Soyaflan in comparison with Climaxan and Active calcium A.A.G. preparations. The Soyaflan drug has shown high effectiveness of preventing osteoporosis, comparable to the dietary supplement used in medical practice – Active calcium AAG.

Keywords: protein complex, phytoestrogens, isoflavones, osteoporosis.

ЛЕКТИНЫ: ОБЗОР СВОЙСТВ И ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

А.В. КОБЕЛЕВ, А.С. СИРОТКИН*

Казанский национальный исследовательский технологический университет

Цель данного обзора — обобщение современных сведений о лектинах и направлениях их применения в биотехнологии. В нем приводятся современные данные о классификации лектинов, их функциональной роли, примерах их использования в биотехнологических производствах, в том числе для создания противоопухолевых препаратов в биохимии и медицине. Сделан вывод, что гликоосвязывающие свойства и разнообразие молекулярных структур, характерных для лектинов, обеспечивают их биологическую активность и определяют их возможности для применения в биотехнологии.

Ключевые слова: лектины, гемагглютинирующая активность, функциональная роль в организме, биотехнология.

Введение

Впервые лектины были выделены в 1888 году Штильмарком из семян клеверины обыкновенной (*Ricinus communis*) [36]. Благодаря специфическому связыванию этих белков с поверхностями клеток животных через специфические сахарные остатки они были названы лектинами [23]. Основным признаком активности лектинов является гемагглютинация, которая в основном регулярно применяется как для обнаружения и характеристики лектинов, так и для изучения взаимодействия лектинов с различными углеводами, ферментами, антителами и клеточными поверхностями [20]. В 1995 году Peumans & Van Damme пришли к выводу, что предпосылкой для белка, называемого лектином, является наличие, по меньшей мере, одного некаталитического домена, который, в частности, обратимо связывается с углеводом. Однако некоторые углеводо-связывающие белки не осаждают гликоконъюгаты или агглютинатные клетки из-за наличия одного углеводосвязывающего сайта. Таким образом, в термин лектин включены различные белки, которые ведут себя по-разному с точки зрения их агглютинации и/или гликоконъюгатного осаждения [39].

Благодаря тому, что лектины имеют различные свойства, которые связаны с их возможностью взаимодействовать с ацетиламино-карбогидратами, аминок-

карбогидратами, сialовыми кислотами, гексозами, пентозами и другими углеводами, они способны проявлять антимикробные и противоопухолевые эффекты, связывая остатки гликоконъюгатов на поверхности клеток или микробов, которые содержат многие из этих сахарных остатков [3, 6, 10, 13, 33, 37, 38, 40].

К настоящему моменту лектины обнаружены во всех живых организмах, однако в основном чаще всего применяются лектины растительного и животного происхождения [3, 13, 38]. Некоторые из них были полностью охарактеризованы и используются как инструменты в клиническом диагнозе. Поэтому идентификация, характеристика и изучение лектинов из любого биологического источника могут быть полезны для дальнейшего применения в области биомедицины.

Многие лектины, выделенные из растений и животных, имеют широкий спектр применения: используются в клинических условиях для определения клеток крови, в качестве носителей химиотерапевтических агентов, митогенов, для фракционирования клеток животных и исследования клеточных поверхностей. Лектины являются важными диагностическими реагентами в области клинической микробиологии [37].

Лектины растительного происхождения отличаются многофункциональностью: они участвуют в защитных реакциях клеток против патогенов и растительоядных насекомых, оказывают влияние на взаимоотношения с микроорганизмами, играя ключевую роль в установлении симбиотических отношений с клубеньковыми бактериями. Инсектицидные свойства лектинов находят применение в генной инженерии для создания устойчивых форм растений, защищенных от насекомых-вредителей, а также бактериальных и вирусных патогенов.

© 2018 г. Кобелев А.В., Сироткин А.С.

* Автор для переписки:

Сироткин Александр Семенович

д.т.н., профессор, заведующий кафедрой промышленной биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский университет»

E-mail: asirotkin66@gmail.com

В литературе имеется достаточное количество сведений о лектинах патогенной микрофлоры и об их роли в иницировании и развитии патологического процесса, тогда как особенности и биологическая роль лектинов сапрофитных микроорганизмов являются практически не изученными. Ряд ученых предполагает их участие в различных физико-химических и физиологических процессах: в адгезии, обеспечении коммуникативности, образовании бактериальных пленок и ансамблей, росте и делении, адаптации, в защите от стрессовых воздействий, доставке питательных веществ, нейтрализации токсинов и других функций, которые в основном, осуществляются нормальной микрофлорой.

Лектины: основные понятия и определения

Лектины (от лат. «legere» — выбирать; здесь: избирательно связываться с теми или иными углеводными рецепторами клеток). Это — белки, не относящиеся к классу иммуноглобулинов, способные к обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов (от лат. «ligo» — связываю; в химии — молекулы или ионы, принимающие участие в связывании) [6, 34].

Установлено, что большинство лектинов, известных на данный момент, мультимерны, состоит из нековалентно связанных субъединиц (рис. 1) [44].

Эти гликопротеины могут содержать две или более одинаковые (конканавалин А) или же различные (агглютинин фасоли обыкновенной) субъединицы. Именно эта мультимерная структура придает лектинам способность агглютинировать клетки или образовывать преципитаты с гликоконъюгатами по механизму, сходному с взаимодействием антиген-антитело [42]. Однако клеточная агглютинация не является обязательной для всех лектинов, хотя большинство из них может агглютинировать те или иные типы клеток. Некоторые лектины могут связываться с клетками и не вызывать агглютинации (сукцинированный конканавалин А), другие лектины могут не связываться с клетками вообще. Это может быть следствием особой структуры лектина или следствием отсутствия необходимого рецептора олигосахарида на поверхности клетки [36]. Так как агглютинация клеток — способ, наиболее часто используемый для оценки активности и количества лектинов, многие неагглютинирующие лектины могут существовать в природе и при этом не выявляться стандартными методами определения.

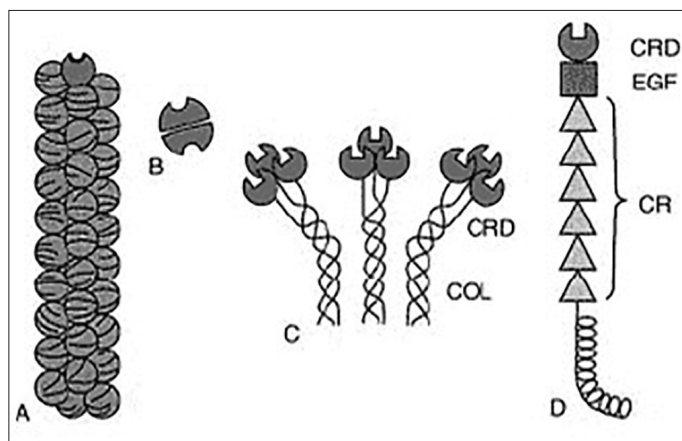


Рис. 1. Схематическое представление общей структуры лектинов из разных источников. А — часть фимбрии *Escherichia coli*. Фимбрия собрана из различных типов субъединиц, только одна из которых (с вырезами) содержит сайт, связывающий углевод. В — димерный бобовый лектин (из чечевицы или гороха). С и D — лектины млекопитающих; С — растворимый маннозасвязывающий лектин, С-лектин и D — Е-селектин. Спираль представляет собой мембрано-охватывающий и цитоплазматический домены. COL — коллагеновая область. CR — дополняет регуляторные повторы. EGF — эпидермальный доменоподобный фактор роста. CRD — домен распознавания углеводов. Отступы представляют собой связующие сайты

Лектины способны проявлять токсическую активность [13, 28]. Это связано с тем, что одна часть лектиновых субъединиц, составляющих гликопротеин, может быть токсином, а другие части при этом являются лектиновыми. Порой такие лектины не проявляют агглютинирующей активности и, следовательно, не обнаруживаются при стандартном анализе [25]. Известны некоторые высокотоксичные лектины, такие как лектин клещевины — рицин, а также арбин, выделенный из растения *Arbus precatorius*. Большинство лектинов обладает низкой токсичностью и опасно для жизни человека и животных только в значительных количествах. Таким, например, является конканавалин А, выделенный из растения *Concanavalia ensiformis* [24, 25]. Однако даже абсолютно не проявляющие токсических свойств лектины могут оказывать повреждающее действие на организм человека и животных в том случае, когда в пищу употребляются белковые продукты, содержащие активные лектины [34].

Во всех живых организмах биологические реакции с участием лектинов делятся на два типа [17, 27]:

1. Непосредственное взаимодействие с соответствующими углеводными остатками, которое

приводит к реакции агглютинации, адгезии или преципитации.

- Опосредованное сигнальное влияние, которое индуцирует сложную цепь метаболических превращений (регуляция деления клеток, миграция лейкоцитов, секреция цитокинов мононуклеар, апоптоз и т.д.).

В 1957 году Мекеле сформировал одну из первых классификаций, основанную на углеводной специфичности лектинов [35]. Более новая система классификации лектинов была предложена в 1998 г. и состояла из семи отдельных семей по сходству последовательностей и их эволюционных отношений [46].

В настоящее время известны различные классификации лектинов, в основе которых лежат такие принципы, как: соотношение белка и углеводов в молекуле лектина; их биологическая активность; происхождение лектинов; локализация источника выделения; функциональная активность; антигенная специфичность в отношении эритроцитов, лимфоцитов и других биологических объ-

ектов; валентность и число субъединиц в молекуле белка; наличие различных доменов (структурных и функциональных); антигенная специфичность лектинов; специфичность к моно- и дисахарам; специфичность к олисахаридам [10]. Существуют и другие классификации лектинов — по содержанию ионов металлов, наличию S-S связей и т.д., однако наиболее важной и значимой является классификация по углеводной специфичности [6].

Для определения углеводной специфичности выявляют сахарид, отличающийся наиболее сильным ингибирующим эффектом, однако не для всех лектинов подобраны моно- или олигосахаридные ингибиторы (табл. 1). Лектины с одинаковой специфичностью по отношению к моносахаридам могут отличаться по сродству к ди-, полисахаридам и гликопептидам. На основании конкурентного анализа и данных аффинной хроматографии выделяют шесть классов лектинов, связывающих D-глюкозу или D-маннозу, ацетил-D-глюкозамин, ацетил-D-галактозамин, D-галактозу, L-фруктозу и смешанные углеводы [12].

Таблица 1

Углеводная специфичность некоторых растительных лектинов

Аббревиатура	Латинское название лектинов	Происхождение	Углеводная специфичность
WGA	<i>Triticum aestivum</i> L.	Зародыши пшеницы	Сиаловая кислота, GlcNAc
UDA	<i>Urtica dioica</i> L.	Корневища крапивы	GlcNAc
SBA	<i>Glycine hispida</i> L.	Семена сои	D-галактоза
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i> L.	Семена канавалии мечевидной	D-глюкоза, D-манноза
LVA	<i>Leucojum vernum</i> L.	Трава белоцветика весеннего	Олигомеры маннозы
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Семена арахиса	β ,1-3-галактозо-N-ацетил-D-галактозамин
CABA	<i>Caragana arborescens</i> L.	Кора караганы древовидной	GlcNAc
VAA	<i>Viscum album</i> L.	Омела белая	D-галактоза
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Лейкоагглютинин семян фасоли обыкновенной	D-галактоза, манноза, GlcNAc
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Эритроагглютинин семян фасоли обыкновенной	β ,1-4-глюкозо-N-ацетил- β -манноза, β ,1-3-галактозо-N-ацетил-D-галактозамин
VSA	<i>Vicia sativa</i> L.	Семена вики посевной	D-глюкоза, D-манноза
SNA	<i>Sambucus nigra</i> L.	Кора бузины черной	N-ацетил-D-лактозамин, лактоза

Современная классификация лектинов была построена на биохимических свойствах растительных и животных лектинов, изученных в основном с помощью их гемагглютинации и поделенных на следующие типы: R-тип, L-тип, C-тип, P-тип (манноза-6-фосфат-связывающие), Ig-тип (иммуноглобулино-подобные лектины) и галектины [15].

Свойства лектинов

Лектины играют важную роль в системе организма, выполняя разнообразные жизненно необходимые функции. Показано, что они участвуют в таких фундаментальных процессах, как оплодотворение, эмбриогенез, иммунный ответ, рост, пролиферация и др. [41, 42].

В растениях лектины принимают участие в регуляции деления клеток при прорастании, включая и процесс органогенеза, при котором из семян формируется растение [15, 41]. Они участвуют в регуляции активности ряда ферментов, в том числе обуславливающих работу ионных насосов [22], выполняют функцию запасных белков, представляющих собой источник аминокислот для быстрого роста и развития [37, 31]. Кроме того, лектины корневой системы являются защитой растений от болезнетворных микроорганизмов, низших грибов и растительноядных насекомых, а также участвуют в углевод-белковом узнавании в системе азотфиксирующих систем (бактерия-растение) [9, 19, 29, 37, 40].

В организме животных лектины также регулируют множество функций:

- определяют адгезивность. Лектины-адгезины, которые находятся на поверхности бактерий и вирусов, служат для того, чтобы избирательно связываться с клетками макро- и микроорганизмов и инфицировать их [7, 40];
- исследуют структуру клеточной поверхности. На поверхности мембраны расположены разнообразные углеводные детерминанты, детекция которых специфическими лектинами представляет собой важный элемент в диагностике физиолого-биохимического состояния клетки [11];
- эндогенные лектины влияют на функционирование ионных каналов в мембране клетки, таким образом воздействуя на серию метаболических реакций [7];
- способны взаимодействовать с ферментами или модуляторами ферментов в организме [3];
- известны лектины-ферменты (бифункциональные лектины) [25];
- выполняют сигнальную функцию [2];
- обладают митогенной активностью, то есть являются веществами, влияющими на циклы клеточного деления [14];
- способны индуцировать синтез лимфоцитами разнообразных лимфокинов, биологически активных соединений, способных регулировать иммунологические реакции, рост клеток, миграцию макрофагов, цитотоксическое действие [1];
- способны влиять на образование интерферона Т-лимфоцитами, удалять из печени высших организмов гепатоциты и купферовские клетки, измененные в процессе старения [6].
- участвуют в адаптации к воздействию стрессовых факторов окружающей среды [16].

Применение лектинов

В настоящий момент известны несколько подходов для применения лектинов [3, 33]:

1) неиммобилизованные лектины могут быть использованы для изучения метаболических изменений в клетках и тканях (лечение болезней, защита от микроорганизмов, усиление роста растений и животных);

2) в качестве зондов меченых лектинов (анализ углеводов, диагностика заболеваний);

3) иммобилизованные лектины (хроматография) (анализ лектинов, диагностика заболеваний);

4) перенос генов, ответственных за синтез лектинов, в растительный геном (обеспечение защиты растений от биотических и абиотических стрессов, регулирование роста растений, образование растительно-микробных систем, повышение активности почвы микроорганизмами и стабильности ферментов при тепловой инактивации).

Для практического использования из разнообразных источников с помощью мутагенеза и методов геной инженерии получают новые лектины с широким спектром полезных свойств [1]. Генная инженерия, дающая возможность внедрять гены лектинов, является перспективным способом увеличения продукции лектинов как растениями, так и микроорганизмами.

Интерес к лектинам возник уже давно, так как к нынешнему моменту они обнаружены, выделены и охарактеризованы практически во всех живых организмах: от вирусов до млекопитающих и человека [32, 36, 48]. Они оказываются привлекательными благодаря широкому спектру действия. Традиционным является использование лектинов как молекулярных зондов при изучении структуры и функционирования мембран самих клеток в норме и при патологических состояниях.

Сейчас лектины исследуются как фармакологически активные реагенты с диагностическими, антивирусными, иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами [8, 47]. Перспективными в этом отношении представляются лектины бактерий, такие как, например, лектины сапрофитных бацилл, для которых показано направленные действие на иммунный ответ макроорганизма и на индукцию гамма-интерферона [27].

Благодаря своим свойствам связывать сахара и их остатки лектины обладают широким спектром действия на разнообразные мембраны, клеточные оболочки и другие растительные и животные структуры, ввиду чего они активно используются в различных областях современной медицины, биотехнологии, иммунохимии и цитологии [24, 45, 46].

Важным свойством любых лектинов является их специфичность к определенной углеводной структуре [21]. Например, некоторые лектины могут связывать только структуры с маннозными или глюкозными остатками, тогда как другие узнают только галактозные остатки. Аффинность между лектином и его рецептором может очень сильно варьировать в зависимости от небольших изменений в углеводной структуре рецептора.

Таким образом, свойства лектинов представляются уникальными и позволяют исследователю различать структуры, выделять один тип гликоконъюгатов, клеток или вирусов из смеси или изучать один процесс среди многих. В связи с тем, что биомембраны и клеточные стенки живых организмов содержат гликоконъюгаты, все живые организмы могут быть изучены при помощи лектинов [21, 24].

Лектины обладают митогенной активностью, индуцируя митоз в клетках, которые в норме не делятся [4, 24]. Это свойство лектинов используется в ходе исследования blastogenesis лимфоцитов, а также в процессе биохимических и структурных изменений, связанных с митогенезом.

Лектины используются в качестве биоэффекторов. Их применяют как трансформанты, триггеры, супрессоры, фузогены, флокулянты и дефлокулянты [24].

Важное значение имеют лектины в роли носителей — бифункциональных лектинов. Огромный интерес представляют конъюгаты лектинов с антителами, ферментами, антибиотиками и другими лекарственными препаратами. Подобные конъюгаты применяются как противораковые средства [4].

Лектины используются в качестве чувствительных биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии [18].

Лектины также широко применяются в качестве сорбентов. Огромное распространение получила аффинная хроматография с использованием лектинов. Имобилизованные лектины представляют собой новый тип аффинных сорбентов, которые применяются для очистки и разделения сходных по свойствам ферментов, разделения форм фермента и изучения особенностей олигосахаридной структуры их углеводной части. Благодаря тому, что углеводная часть ферментов и других, биологически активных гликоконъюгатов не формирует их активные центры, такие белки не изменяются в функциональном отношении в результате лектиновой хроматографии. Наиболее интересным вариантом такой хроматографии

считают аффинную хроматографию гликоконъюгатов с использованием лектинов при высоких давлениях. При этом учитывается влияние высокого давления на способность иммобилизованного лектина взаимодействовать с углеводами и на конформационные изменения белковой части лектинов [21]. Также лектины используют в аффинном электрофорезе как свободные лиганды, либо как иммобилизованные в полиакриламидном геле [26, 45].

В инженерной энзимологии наборы иммобилизованных лектинов, меченных маркером, используются для тестирования фермента, модифицированного по углеводной части, полученные конъюгаты которой применяются при терапии заболеваний [26, 30].

Лектины применяются для гемосорбции. Так как все белки крови человека, кроме альбумина, являются гликопротеинами, лектины используются для связывания аномальной по углеводной части белков крови при различных заболеваниях. В этом случае предпочтение отдается лектинам без токсичной части. Также лектины используются для определения группы крови [24, 43].

Лектины широко используются для очистки вирионов, мембран, органоидов и клеток. В основе этого применения лектинов лежит их сродство к мембранно-связанным гликоконъюгатам. Таким образом, на лектиновых сорбентах можно связывать надмолекулярные белковые комплексы, в том числе и полифункциональные системы ферментов [26].

В настоящее время лектины широко применяются в медицине:

- для диагностики онкопатологии и язв различной природы, а также опухолей в ротовой полости, мочевом пузыре, молочной железе, щитовидной железе, органах желудочно-кишечного тракта, легких;
- для иммунодиагностики;
- для выявления чувствительности различных клеток к радиации;
- для отделения нормальных клеток от клеток аденомы и карциномы предстательной железы [5, 6, 30].

Было показано, что лектины способны связывать вирусы гриппа и инактивировать их деятельность. Выделенный белок коллектин, представляющий собой длинную белковую цепь с несколькими активными участками — доменами, которые обладают лектиновой активностью, имеет выраженную способность инактивировать вирус гриппа [43].

Ныне во многих странах интенсивно ведутся работы по выделению и изучению лектинов из различных

растений и животных. Были выделены сотни лектинов из семян, корней и коры различных растений, из грибов, бактерий, вирусов, водорослей и губок, из моллюсков, рыбьей икры, из жидкостей тела беспозвоночных и низших позвоночных, а также из клеточных мембран млекопитающих. Продолжает оставаться актуальным изучение возможности использования различных лектинов в медицинской и научно-исследовательской сфере [5, 11, 30].

Однако в преобладающем большинстве проводимых исследований используют лектины растительного происхождения. Изучение свойств и функций лектинов бактерий и, в частности, непатогенных бактерий, открывает возможность использования их в качестве своеобразных структурных и функциональных зондов в изучении углеводов-связывающих рецепторов клеточных мембран, характер гликозилирования которых, как известно, играет существенную роль в регуляции различных метаболических процессов в организме.

Следовательно, исследование лектинов является в настоящее время одним из наиболее актуальных и перспективных направлений современной биологии, связанных с применением лектинов в следующих областях:

- для диагностики тех или иных заболеваний;
- для идентификации некоторых микроорганизмов;
- в качестве специфических реагентов, избирательно сорбирующих те или иные сложные вещества: гликопротеиды, гормоны, сиалопротеиды и т.д. (таким образом можно получить ценные вещества, используемые как при лечении многих тяжелых заболеваний, так и в других областях прикладной науки);
- в качестве реагентов, участвующих в создании нового поколения препаратов — своеобразных гибридов лектинов и антител для воздействия на те органы и ткани, где действие лектина полезно. Например, для лечения рака лимфатических узлов использовался ридин, «сшитый» с антителами, избирательно доставляющими этот токсичный лектин к опухоли [6].

Заключение

Таким образом, лектины представляют собой разнородную группу многовалентных белков неиммунного происхождения, которые способны распознавать и обратимо связывать различные углеводные структуры (моносахариды, олигосахариды и гликоконъюгаты), не изменяя их. Их классификация основана на их специ-

фичности, биохимических свойствах, биологическом распространении и углеводов-связывающих доменах.

Лектины обладают многофункциональной ролью: участвуют в защитных реакциях клеток, а также оказывают влияние на создание консорциумных связей между различными организмами, способны инактивировать вирусы разных таксономических групп, связывая углеводные остатки их оболочек. Глико-связывающие свойства и разнообразные молекулярные структуры, наблюдаемые в этих классах белков, обеспечили им широкий спектр биологической активности и сделали их объектом биотехнологического применения. Также они способны хранить информацию, осуществляемую углеводной составляющей. На данный момент исследование биохимии углеводов показало большой потенциал сахарного «алфавита» для кодирования [20, 22, 37].

Лектины играют важную роль в укладке белка, межклеточной адгезии, взаимодействии между хозяином и патогеном, клеточной сигнализации, являются потенциальными мишенями для разработки противовирусных препаратов и вакцин, а также рассматриваются в качестве мишеней для лекарственных средств. Эти гликопротеины нашли свое приложение во многих биологических направлениях, таких как таксономические, эмбриологические и бактериологические исследования, исследования рака, сортировка клеток, сортировка мутантных и опухолевых клеток, выделение мембранных и сывороточных гликоконъюгатов и т.д.

Литература

1. Абросимова О.В. Изучение функциональной активности макрофагов на фоне действия лектина *Paenibacillus polymyxa* // Вестник Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова. — 2006. — № 1. — С. 3–6.
2. Аленькина С.А., Петрова Л.П., Соколова М.К., Чернышова М.П., Трутнева К.А., Богатырев В.А., Никитина В.Е. Сравнительная оценка индуктивного воздействия различных по антигенным свойствам лектинов азоспирилл на сигнальные системы корней проростков пшеницы // Микробиология. — 2014. — Т. 83. — № 3. — С. 336–345.
3. Аленькина С.А., Жаркова В.Р., Никитина В.Е. Стабилизирующее влияние лектинов азоспирилл на активность (бета)-глюкозидазы // Прикладная биохимия и микробиология. — 2007. — Т. 43. — № 6. — С. 653–656.
4. Алешин В.Н., Лобанов В.Г., Минакова А.Д. Лектины: свойства, сферы применения и перспективы исследования // Известия вузов // Пищевая технология. — 2005. — № 1. — С. 5–7.

5. Багаева Т.В., Мухаммадиев Р.С., Мухаммадиев Р.С., Алимова Ф.К. Скрининг микромицетов по способности к синтезу лектинов // Микология и фитопатология. — 2014. — Т. 48. — Вып. 2. — С. 107–111.
6. Игнатов В.В. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. — М.: Наука, 2005. — 262 с.
7. Игнатов В.В. Углеводузнающие белки — лектины // Биология (Соросовский образовательный журнал). — 1997. — № 2. — С. 15–20.
8. Карпова И.С., Корецкая И.В., Римийа В.М. Лектины лекарственных растений как фармакологически активные вещества // Клінічна фармація. — 1999. — Т. 3. — № 2. — С. 148–150.
9. Косенко Л.В. Сравнительная характеристика углеводсвязывающих свойств лектинов из семян бобовых растений // Физиология растений. — 2002. — Т. 49. — № 5. — С. 718–724.
10. Луцук М.Д., Панасюк Е.Н., Луцук А.Д. Лектины. — Львов: Вища школа, 1981. — 156 с.
11. Луцук М.Д. Применение лектинов для изучения структуры и функции гликопротеинов / V Всесоюзный биохимический съезд, тезисы докладов. — Киев.-М.: Наука, 1985. — Т. I. — С. 270–271.
12. Марков Е.М., Хавкин Э.В. Лектины растений — предполагаемые функции // Физиология растений. — 1983. — Т. 30. — Вып. 5. — С. 852–867.
13. Мухаммадиев Р.С. Лектин микромицета *Rhizoctonia solani*: характеристика, свойства и биологическая активность: дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Казан. фед. университет. — Казань, 2017. — 132 с.
14. Никитина В.Е., Итальянская Ю.В., Карпунина Л.В., Пономарева Е.Г., Кураксина С.К., Федорова Л.С., Позднякова Л.И. Изучение биологической роли гемагглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий // Изучение и применение лектинов / Кизанд К., Тарту: Уч. зап. Тарт. ун. — 1989. — Т. 2(869). — С. 25–31.
15. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. Функциональная роль лектинов растений как предпосылка для их применения в биотехнологии // Химия растительного сырья. — 2017. — № 1. — С. 21–35.
16. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Карпова И.С., Сацук Е.В., Гетьман Е.И. Внеклеточные лектины сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2014. — Т. 50. — № 3. — С. 256–263.
17. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий. — Киев: Наукова думка, 1992. — 202 с.
18. Соболев С.М., Николаева Т.Н., Григорьева Е.А., Пронин А.В. Роль лектин-субстратного распознавания в иммунорегуляторном взаимодействии интерлейкина-2 и IgG // Медицинская иммунология. — 2010. — Т. 12. — № 1–2. — С. 13–20.
19. Al Atalah B., Smagghe G., Van Damme E.J.M. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects // Plant Sci. — 2014. — Vol. 221–222. — P. 21–28.
20. Ambrosi M., Cameron N.R., Davis B.G. Lectins: Tools for the molecular understanding of the glycodecode // Org. Biomol. Chem. — 2005. — Vol. 3. — P. 1593–1608.
21. Barondes S.H. Lectins: Their multiple endogenous cellular functions // Annual Review of Biochemistry. — 1981. — Vol. 50. — P. 207–231.
22. Bowles D.J. Distribution of lectins in membranes of soybean and peanut plants. I. General distribution in root, shoot and leaf tissue at different stages of growth // Planta. — 1997. — Vol. 145. — No. 2. — P. 193–198.
23. Callow J.A. Plant lectins / In: Smith H. (Ed.) Commentaries in plant science. — Pergamon Press, Oxford, 1976. — P. 221–233.
24. Cheeke P., Shull Lee. Natural toxicants in feed and poisonous plants. — Westport, 1985. — P. 63–64.
25. Etzler M. Chemical taxonomy, molecular biology and function of plant lectins // Progress in Clinical and Biological Research. — 1983. — Vol. 138. — P. 1–5.
26. Etzler M. Distribution and function of plant lectins. — N.Y.: Academic Press, 1986. — 600 p.
27. Gabius H.J. Animal lectins // Eur. J. Biochem. — 1997. — Vol. 245. — P. 543–576.
28. Goldstein I.J., Poretz R.D. Isolation, physico-chemical characteristics, and carbohydrate-binding specificity of lectins / In: Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. (Eds.). The lectins. — Academic Press, Orlando, USA, 1986. — P. 52.
29. Guo P., Wang Y., Zhou X., Xie Y., Wu H., Gao X. Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests // Plant Sci. — 2013. — Vol. 211. — P. 17–22.
30. Howard D.R. Carcinoma-associated cyto-structural antigenic alterations: detection by lectin binding // Cancer. — 1981. — Vol. 47. — No. 12. — P. 2872–2877.
31. Kilpatric D.C., Yeomen M.M., Gould A.R. Tissue and subcellular distribution of the lectin from *Datura stramonium* (thorn apple) // Biochem. J. — 1979. — Vol. 2. — P. 215–219.
32. Kobelev A.V., Bagaeva T.V. Purification and characterization of extracellular lectin extracted from culture liquid *Thermodesulfobacterium mobile* DSM-1128 // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2015. — Vol. 6(4). — P. 2159–2166.
33. Kovalchuk N.V., Melnykova N.M., Musatenko L.I. Role of phytolectins in the life cycle of plants // Biopolym. Cell. — 2012. — Vol. 3. — P. 171–180.
34. Liener I.E. Phytohemagglutinins // Ann. Rev. Plant. Physiol. — 1976. — Vol. 27. — P. 291–319.

35. *Macedo M.L., Olivera C.F., Olivera C.T.* Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – P. 2014–2033.
36. *Manen J.F., Pustai A.* Light and electron microscopic localization of lectins in plant cells and tissues / In: *Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem.* Vol. 3. – Berlin, New York, 1983. – P. 611–622.
37. *Michiels K., Van Damme E., Smagghe G.* Plant-insect interactions: What can we learn from plant lectins? // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* – 2010. – Vol. 73. – P. 193–212.
38. *Muhammadiev R.S., Bagaeva T.V.* Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani* // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2015. – Vol. 6(6). – P. 1756–1763.
39. *Peumans W.J., Van Damme E.J.M.* Lectins as plant defense proteins // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 109. – P. 347–352.
40. *Renata O.D., Leandro S.M., Ludovico M., Octavio L.F.* Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – P. 519–541.
41. *Rüdiger H. & Gabius H.J.* Plant lectins / In: *Gabius H.-J. (Ed.) The Sugar Code. Fundamentals of glycosciences*. – Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2009. – P. 301–315.
42. *Sharon N., Lis H.* *Lectins*. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – 440 p.
43. *Sharon N., Lis H.* Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins // *Science*. – 1972. – Vol. 177(4053). – P. 949–959.
44. *Sharon N., Lis H.* Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition // *Essays Biochem.* – 1995. – Vol. 30. – P. 59–75.
45. *Trombetta E.S., Helenius A.* Lectins as chaperones in glycoprotein folding // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1998. – Vol. 8(5). – P. 587–592.
46. *Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Barre A., Rouge P.* Plant Lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 1998. – Vol. 17(6). – P. 575–692.
47. *Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Pustai A., Bardocz S.* *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. – John Wiley and Sons, Chichester, 1998. – 466 p.
48. *Zhang G., Sun J., Wang H., Ng T.B.* First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom* // *Phytomedicine*. – 2010. – Vol. 17. – P. 775–781.

LECTINS: A REVIEW OF PROPERTIES AND PROSPECTS FOR USE IN BIOTECHNOLOGY

A.V. KOBELLEV, A.S. SIROTKIN

Kazan National Research Technological University

The purpose of this review is to summarize current information about lectins and their applications in biotechnology. It provides modern data on the classification of lectins, their functional role, examples of their use in biotechnology production, including the creation of antitumor drugs in biochemistry and medicine. It is concluded that the glyco-binding properties and the diversity of molecular structures characteristic for lectins ensure their biological activity and determine their potential for use in biotechnology.

Keywords: lectins, hemagglutinating activity, functional role in the organism, biotechnology.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОГРАММНЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА

А.С. ДОБРОНОГОВА*, М.Ю. ЧЕРЕДНИЧЕНКО

Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

За последнее десятилетие метаболомика сформировалась в востребованную самостоятельную науку наряду с геномикой и транскриптомикой. Растет потребность в метаболомных данных в различных областях науки и практики, включая медицину и фармацевтику. Выявляя и количественно определяя метаболиты, ученые могут достичь системного понимания метаболических процессов в организме. Эти исследования дают большой объем данных, которые из-за огромного количества измеряемых переменных часто интерпретируются недостаточно полно. За истекшие годы был разработан ряд вычислительных инструментов, которые позволяют глубже изучать результаты метаболомного анализа. Установление биологического смысла этих данных затруднено, поскольку понимание связей между десятками измененных метаболитов часто зависит от профессионального опыта исследователей и их предположений. Начиная с 2000 года, накопленные знания аккумулировались в структурированные онтологии (описание системы понятий, отношений и механизмов управления в рамках предметной области), помогающие анализировать и повторно использовать данные из разных источников. Вторичный метаболизм представлен в различных онтологиях: модулях (суббазах) KEGG PATHWAY и KEGG MODULES базы данных KEGG, базах MetaCyc и BioCyc на -Cyc-платформе, ChEBI и др. Как правило, в этих базах описываются возможные пути синтеза того или иного вещества и указывается, для каких организмов эти пути характерны. Вторичный метаболомный анализ — интерпретация результатов, полученных в ходе количественного или качественного анализа метаболитов, с помощью биохимических баз данных и программных продуктов, работающих с этими базами данных. Применение программных продуктов позволяет исследователю избежать статистической обработки данных и самостоятельного анализа метаболических баз данных, приводит в текстовом или табличном виде возможные варианты представленности метаболитов либо метаболические карты. Таким образом, вторичный метаболомный анализ существенно упрощается, однако на сегодняшний день рекомендуется анализировать информацию с помощью нескольких программных продуктов, чтобы избежать искажений.

Ключевые слова: метаболомика, вторичный метаболизм, онтологии, базы данных, системная биология, вторичный метаболомный анализ.

Растения являются своего рода лабораториями химического синтеза, использующими свой метаболизм для получения сложной смеси структурно разнообразных химических веществ: примерные оценки указывают на то, что растения производят около 200000 различных химических структур. Вторичные метаболиты вносят наибольший вклад в это структурное многообразие, вероятно, из-за множества физиологических и аллелопатических ролей, которые они выполняют: привлечение или отпугивание насекомых, защита от патогенных микроорганизмов, взаимодействие с соседними видами растений и др. [22]. Разнообразие

метаболитов (представленность по видам растений и тканевая специфичность) рассматривается как важный показатель реакции растений на действие и абиотических факторов: температуры, влажности и т.д. Высокая степень адаптивности путей вторичного метаболизма при ответе на стресс согласуется с существованием больших семейств генов, связанных с метаболизмом, таких как гены цитохрома P450 и UDP-гликозилтрансфераз в растительных геномах.

Метаболомный анализ растений — важная задача современной науки, так как вторичные метаболиты растений востребованы в том числе в медицине и фармацевтике [9, 20].

Метаболом — это биохимический фенотип организма, который является результатом взаимодействия генотипа с окружающей средой; комплекс всех низкомолекулярных метаболитов в клетке, ткани, органе, биологической жидкости, представляющих собой промежуточные или конечные продукты обмена веществ.

© 2018 г. Доброногова А.С., Чередниченко М.Ю.

* Автор для переписки:

Доброногова Анна Сергеевна

аспирант кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева»

E-mail: adobronogova@gmail.com

В свою очередь, метаболомика — научное направление, занимающееся изучением состава метаболома. К ее задачам относятся количественное определение и идентификация метаболитов с помощью набора аналитических и биоинформационных методов, детекция изменений в биохимическом профиле организма как реакции на генетическую модификацию или на изменения в окружающей среде, а также определение регулируемых метаболических путей (набора последовательных реакций, объединенных одной функцией) и их взаимосвязей.

За последнее десятилетие метаболомика стала мощным инструментом, используемым в различных областях науки для построения гипотез, изучения функций генов, открытия биомаркеров и дополнения протеомных и транскриптомных данных.

Существует две категории метаболомных исследований:

- целевая метаболомика: количественный анализ ограниченного числа веществ, известных и ожидаемых в образце;
- нецелевая метаболомика: обзорный анализ всех метаболитов, включая неизвестные, дающий целостную картину исследуемой биологической системы [1].

Нецелевая метаболомика ставит одну из наиболее сложных задач, поскольку наборы данных, полученные из опытов по изучению метаболизма, чрезвычайно велики и, следовательно, их нелегко интерпретировать, сохраняя при этом биологический смысл. Проблема заключается в трудности понимания того, насколько связаны друг с другом многочисленные химические соединения, присутствующие в клетках. Опираясь на свой опыт, экспериментаторы могут интуитивно объяснять результаты, используя знания механизмов метаболизма и условий эксперимента, или вручную сопоставлять их с известными метаболическими путями. Однако компьютерный анализ дает возможность получить более полное толкование экспериментальных данных.

Для обработки экспериментальных данных нужны подходы, сочетающие в себе сильные стороны современных статистических методов с последними достижениями в области метаболомного анализа, например, метод молекулярных сетей, представляющий собой организацию данных тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). МС/МС позволяет легко классифицировать неизвестные метаболиты исключительно на основе их моделей фрагментации: химическое строение молекул определяет, каким образом они будут фрагментированы МС/МС в газовой фазе, и поэтому предполагается, что

две связанные молекулы будут иметь похожие фрагменты ионного спектра. Молекулярная сеть организует данные МС/МС как сопоставительную спектральную сеть, тем самым сравнивая химический состав, который был определен в результате эксперимента, с результатами МС/МС [3, 18].

За последние два десятилетия объем накопленной биохимической информации невероятно возрос, что потребовало ее хранения в больших базах данных. Так, возникли, например, хемоинформатические базы данных, такие как PubChem [21] и ChEBI [8]. Эти базы данных связаны друг с другом и с другими базами данных, такими как Chemical Abstract Service (CAS) [23] и др.

Метаболомика основана на данных экспериментального определения метаболитов (количественного и качественного) в образце (газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС), МС/МС и ЯМР-спектрометрия, ВЭЖХ-МС др.). Этот блок методов можно обозначить как первичный метаболомный анализ. По мере развития метаболомных баз данных сформировался новый подход к обработке экспериментальных данных — вторичный метаболомный анализ, который представляет собой процедуру интерпретации экспериментальных данных (первичного метаболомного анализа). Полученный набор данных подвергается при этом анализу с использованием информации, полученной из биохимических баз данных.

Эти базы данных обеспечивают основу для интерпретации экспериментальных данных, предоставляя информацию о метаболитах: какие ферментативные реакции потребляют или продуцируют метаболиты, в каких метаболических путях они участвуют. Исследователи могут использовать их для анализа выходных данных своих экспериментов, например, базу Общества метаболомики (www.metabolomicsociety.org/database). Кроме того, конкретно для развития метаболомики были разработаны масс-спектральные базы данных, такие как Golm Metabolome Database (GMD), которые связывают масс-спектр и время хроматографического удержания с конкретными соединениями: исследователь может сравнить полученный масс-спектр и время удержания со справочной библиотекой GMD [10, 15].

Основной базой данных, которая широко применяется для интерпретации метаболомных данных, является Киотская энциклопедия генов и геномов (KEGG), которая разделена на несколько суббаз [13]:

- KEGG REACTION — биохимические реакции;
- KEGG COMPOUND и KEGG GLYCAN — метаболиты;

- KEGG ENZYME — энзимы;
- KEGG GENES — гены;
- KEGG PATHWAY и KEGG MODULES — метаболические пути.

Еще один значимый ресурс для исследователей метаболизма — MetaCyc, мультиорганизменная база данных метаболических путей (<https://metacyc.org/>) [14], целью которой является каталогизация всей совокупной системы метаболизма с сохранением максимума информации по каждому экспериментально установленному метаболическому пути. Так, MetaCyc содержит информацию о путях, участвующих в первичном и вторичном метаболизме, а также о связанных с этими путями метаболитах, реакциях, ферментах и генах [2].

Эти базы данных постоянно обновляются и аннотируются на протяжении почти 20 лет и поэтому содержат огромный объем информации. В настоящее время KEGG и MetaCyc представляются самыми крупными (большинство организмов), всесторонними (то есть отображают связь метаболита и определяющего его гена) и доступными. На их основе часто разрабатываются платформы для интерпретации метаболомных данных [4]. Базы данных KEGG и MetaCyc содержат обобщенный набор метаболических путей, которые более или менее одинаковы на протяжении всей жизни организма. При этом в мультиорганизменной базе KEGG по запросу доступны специальные аннотации по организмам, а на платформе -Cyc созданы отдельные базы данных для ряда организмов (некоторые из них построены на основе расчетных данных, другие тщательно модерировались кураторами), такие как AraCyc для *Arabidopsis* [17].

Поскольку метаболомика остается развивающейся областью, группы ученых продолжают разрабатывать и выпускать биоинформационные инструменты (программные продукты для анализа метаболомных данных) с использованием разнообразных алгоритмов обработки данных и различных баз. Одним из основных преимуществ разрабатываемых инструментов вторичного метаболомного анализа служит их удобный графический интерфейс. Это обеспечивает большую доступность и исключает необходимость изучения сложных инструментов, на которых они разработаны, в частности, языка программирования R (www.R-project.org), широко используемого как статистическое программное обеспечение для анализа данных [5].

Как правило, современные инструменты разделяют на две категории (хотя некоторые инструменты могут выполнять обе функции одновременно): анализ представленности и метаболическое картирование.

Анализ представленности — получение информации о наличии метаболитов в образце [19]. Для анализа представленности требуются два объекта: список элементов (метаболитов), полученных в результате эксперимента, и набор аннотаций (описание элементов в терминах онтологии), полученных из биохимических баз данных.

Метаболическое картирование обеспечивает визуальное представление метаболомных данных, отражая определенные метаболиты (и их количество) на графике, получаемом из биохимической базы данных.

Большая часть инструментов метаболомики разработана для анализа информации по тканям и органам человека, однако существуют и универсальные программные продукты, пригодные для анализа вторичного метаболизма растений.

Так, IMPaLA (Integrated Molecular Pathway Level Analysis) — комплексный анализ молекулярного пути — инструмент, предназначенный для одновременного анализа представленности как метаболомных, так и протеомных или транскриптомных наборов данных [12], принимая в качестве исходных данных список метаболитов.

Другой инструмент, MetExplore, может анализировать метаболические сети, основываясь лишь на информации, извлеченной из метаболических баз данных, и идентифицировать все пути, в которых могут быть задействованы отдельные метаболиты [7]. Основными функциями MetExplore являются метаболическое картирование и вычислительный анализ. Инструмент может идентифицировать реакции/метаболиты, которые уникальны в пределах сети, тогда как анализ предшественников позволяет понять, какие метаболиты необходимы/возможны для производства других метаболитов в сети.

Так, например, на рисунке 1А можно видеть фрагмент списка метаболитов (в виде гиперссылок), идентифицированных в эндосимбионте тлей, — бактерии *Buchnera aphidicola*. В той же таблице отражаются молекулярная масса, химическая формула, перечень метаболических путей с участием конкретного метаболита, а также его место в цепи химических реакций. Также ресурс дает возможность визуализировать положение метаболита на графическом представлении метаболической сети (рис. 1В). Однако метаболические сети часто слишком сложны, и тогда ухудшается качество представления и возможность интерпретации данных. Поэтому MetExplore позволяет выделить подсети с участием конкретного метаболита (рис. 1С).

Вычислительные средства, предоставляемые MetExplore, могут быть весьма полезны для исследователей, работающих с организмами, имеющими базу данных -Cyc (например, AraCyc).

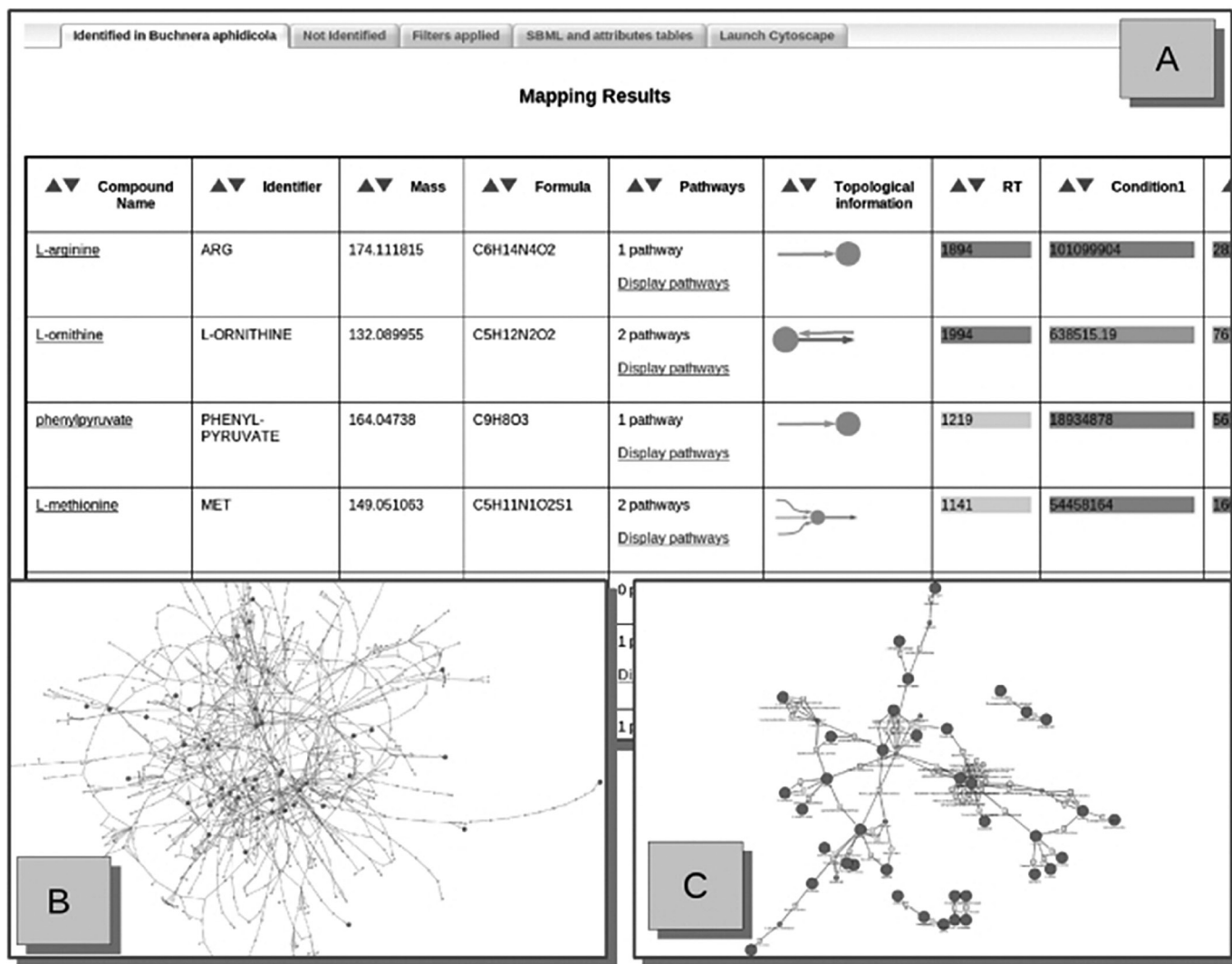


Рис. 1. Результат работы в MetExplore — определение метаболитов *Buchnera aphidicola*: А — таблица результатов, отражающая содержание метаболитов; В — визуализация выявленных метаболитов в метаболической сети; С — визуализация подсетей, связывающих выявленные метаболиты [7]

Средство визуализации и анализа сетей со связанными экспериментальными данными (VANTED, Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) — еще один инструмент, позволяющий отображать информацию о метаболоме в сети KEGG [11]. В отличие от большинства других программ, работающих в режиме онлайн, VANTED должна быть установлена на компьютере пользователя. Он предоставляет множество опций для генерации сетей, включая загружаемые KEGG-карты для конкретных организмов, а также картографирование на основе корреляционных сетей. При этом система обнаруживает сходство в данных и группирует их в единую карту (например, наборы данных о метаболите и наборы данных об активности фермента визуализируются в различных метаболических картах, строятся корреляционные сети и обнаруживают-

ся определенные закономерности). Эти статистически ориентированные карты, а также удобное представление данных о распространенности метаболитов делают ее мощным инструментом для вторичного метаболического анализа. VANTED часто обновляется и используется для интерпретации результатов в широком спектре метаболических исследований, включая влияние засухи на листья пшеницы [6] или влияние глюкозного голодания на *Staphylococcus aureus* [16].

Достичь хорошей биологической интерпретации метаболических данных легче в медицинских исследованиях человека и при использовании хорошо изученных модельных организмов из-за преобладания и качества баз данных, связанных с этими объектами. Таким образом, гораздо проще проводить метаболический анализ человека, *Escherichia coli* и *Arabidopsis thaliana*

по сравнению, например, с каким-либо недавно выделенным бактериальным штаммом. Определенное решение представляет собой MetaСус и связанные с ней инструменты, хотя создание специфичной для конкретного организма базы данных «-Сус» из аннотированного генома остается сложной задачей, требующей времени.

Что касается текущего набора доступных инструментов, то все они имеют сильные и слабые стороны. Поэтому для более точной интерпретации полученных данных необходимо применять, по меньшей мере, один анализ представленности и один инструмент визуализации. Учитывая сложность метаболомных данных, важно также внимательно относиться к результатам вторичного анализа и проводить тщательную проверку и логическую биологическую интерпретацию данных. Крайне полезным для развития вторичного метаболомного анализа было бы широкое использование исследователями имеющихся программных продуктов, а также обратной связи в виде их дополнения актуальными экспериментальными данными.

Литература

1. Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д., Войтенко Н.Г. Метаболомика на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики // Успехи современной биологии. — 2015. — Т. 135. — № 1. — С. 3–17.
2. Доброногова А.С., Чередниченко М.Ю. Вторичный метаболизм высших растений в биоонтологиях // Труды Кубанского государственного аграрного университета. — 2017. — № 66. — С. 94–97.
3. Allard P.-M., Péresse T., Bisson J., Gindro K., Marcourt L., Pham V.C., Roussi F., Litaudon M., Wolfender J.-L. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication // Analytical Chemistry. — 2016. — Vol. 88(6). — P. 3317–3323.
4. Altman T., Travers M., Kothari A., Caspi R., Karp P.D. A systematic comparison of the MetaCyc and KEGG pathway databases // BMC Bioinformatics. — 2013. — Vol. 14. — P. 112.
5. Bloomfield V.A. Using R for Numerical Analysis in Science and Engineering. — Chapman & Hall/CRC, 2014. — 359 p.
6. Bowne J.B., Erwin T.A., Juttner J., Schnurbusch T., Langridge P., Bacic A., Roessner U. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level // Molecular Plant. — 2012. — Vol. 5. — No. 2. — P. 418–429.
7. Cottret L., Wildridge D., Vinson F., Barrett M.P., Charles H., Sagot M.-F., Jourdan F. MetExplore: A web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks // Nucleic Acids Research. — 2010. — Vol. 38. — W132–W137.
8. Degtyarenko K., de Matos P., Ennis M., Hastings J., Zbinden M., McNaught A., Alcántara R., Darsow M., Guegj M., Ashburner M. ChEBI: A database and ontology for chemical entities of biological interest // Nucleic Acids Research. — 2008. — Vol. 36. — D344–D350.
9. Frédérick M., Pirotte B., Fillet M., de Tullio P. Metabolomics as a challenging approach for medicinal chemistry and personalized medicine // Journal of Medicinal Chemistry. — 2016. — Vol. 59. — P. 8649–8666.
10. Hummel J., Selbig J., Walther D., Kopka J. The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling / In: Nielsen J., Jewett M.C. (eds.). Metabolomics. Topics in Current Genetics, vol. 18. — Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. — P. 75–95.
11. Junker B.H., Klukas C., Schreiber F. VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks // BMC Bioinformatics. — 2006. — Vol. 7. — P. 109. doi: 10.1186/1471-2105-7-109.
12. Kamburov A., Cavill R., Ebbels T.M.D., Herwig R., Keun H.C. Integrated pathway-level analysis of transcriptomics and metabolomics data with IMPaLA // Bioinformatics. — 2011. — Vol. 27(20). — P. 2917–2918.
13. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // Nucleic Acids Research. — 2000. — Vol. 28(1). — P. 27–30.
14. Karp P.D., Riley M., Paley S., Pellegrini-Toole A. The MetaCyc database // Nucleic Acids Research. — 2002. — Vol. 30(1). — P. 59–61.
15. Kind T., Wohlgemuth G., Lee D.Y., Lu Y., Palazoglu M., Shahbaz S., Fiehn O. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry // Analytical Chemistry. — 2009. — Vol. 81. — P. 10038–10048.
16. Liebeke M., Dörries K., Zühlke D., Bernhardt J., Fuchs S., Pané-Farré J., Engelmann S., Völker U., Bode R., Dandekar T., Lindequist U., Hecker M., Lalk M. A metabolomics and proteomics study of the adaptation of *Staphylococcus aureus* to glucose starvation // Molecular BioSystems. — 2011. — Vol. 7. — P. 1241–1253.
17. Mueller L.A., Zhang P., Rhee S.Y. AraCyc: A biochemical pathway database for *Arabidopsis* // Plant Physiology. — 2003. — Vol. 132. — P. 453–460.
18. Quinn R.A., Nothias L.-F., Vining O., Meehan M., Esquenazi E., Dorrestein P.C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy // Trends in Pharmacological Sciences. — 2017. — Vol. 38(2). — P. 143–154.
19. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-

- wide expression profiles // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2005. – Vol. 102(43). – P. 15545–15550.
20. Tolstikov V. Metabolomics: Bridging the gap between pharmaceutical development and population health // Metabolites. – 2016. – Vol. 6(3). – E20. doi: 10.3390/metabo6030020.
21. Wang Y., Xiao J., Suzek T.O., Zhang J., Wang J., Bryant S.H. PubChem: A public information system for analyzing bioactivities of small molecules // Nucleic Acids Research. – 2009. – Vol. 37. – W623–W633.
22. Weng J.-K., Philippe R.N., Noel J.P. The Rise of chemodiversity in plants // Science. – 2012. – Vol. 336(6089). – P. 1667–1670.
23. Whitley K.M. Analysis of SciFinder Scholar and Web of Science citation searches // Journal of the American Society for Information Science and Technology. – 2002. – Vol. 53(14). – P. 1210–1215.

APPLICATION OF SOFTWARE PRODUCTS FOR SECONDARY METABOLOMIC ANALYSIS

A.S. DOBRONOGOVA, M.Yu. CHEREDNICHENKO

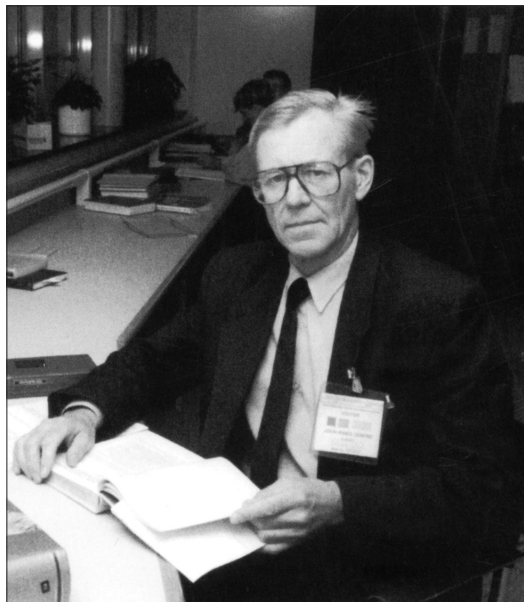
Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy

Over the past decade, metabolomics has formed into a demanded independent science along with genomics and transcriptomics. There is a growing need for metabolic data in various fields of science and practice, including medicine and pharmaceuticals. By identifying and quantifying metabolites, scientists can achieve a systematic understanding of metabolic processes in an organism. These studies provide a large amount of data, which, because of the huge number of measured variables, are often not fully interpreted. In recent years, a number of computational tools have been developed that allow a deeper study of the results of metabolic analysis. Establishing the biological meaning of these data is difficult, because understanding the connections between dozens of altered metabolites often depends on the professional experience of the researchers and their assumptions. Since 2000, the amassed knowledge has been accumulated in structured ontologies (describing system of notions, relations and control mechanisms in the context of data domain) helping to analyze and to use iteratively the data from diverse sources. Secondary metabolism in different ontologies is presented: KEGG PATHWAY and KEGG MODULES modules (sub-databases) in KEGG, MetaCyc and BioCyc databases on the Cyc platform, ChEBI, etc. As a rule, these databases describe possible ways of substance synthesizing and it is indicated for which organisms these paths are characteristic. Secondary metabolic analysis is an interpretation of the results obtained from quantitative and qualitative metabolite analysis, using biochemical databases and software products working with these databases. The use of software products allows the researcher to avoid statistical processing of data and independent analysis of metabolic databases, quotes in the textual or tabular form possible variants of the metabolite representation or metabolic maps. Thus, secondary metabolic analysis is greatly simplified, but to date it is recommended to analyze the information using several software products to avoid distortion.

Keywords: metabolomics, secondary metabolism, ontologies, databases, systems biology, secondary metabolomic analysis.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2018 ГОДА*

НЕКРОЛОГ

Памяти Вавилова Юрия Николаевича
(1928–2018)

18 апреля 2018 года скончался доктор физико-математических наук Юрий Николаевич Вавилов, сын Николая Ивановича Вавилова, много сделавший для исследования жизни и деятельности своего великого отца, восстановления его доброго имени и увековечения его памяти.

Ю.Н. Вавилов родился 6 февраля 1928 года в Ленинграде от второго брака Н.И. Вавилова с Барулиной Еленой Ивановной, сотрудницей ученого еще по Саратову, ставшей его спутницей по жизни и соратницей в научных делах. Ю.Н. Вавилов сохранил в памяти и рассказал в своих воспоминаниях о фактах общения с отцом в 1930-е годы, а также об обстоятельствах, связанных с его арестом и гибелью в начале 1940-х годов.

В 1946 г. Ю.Н. Вавилов окончил школу с серебряной медалью и поступил на физический факультет Ленинградского университета. По окончании университета и аспирантуры он трудился вплоть до настоящего времени в Физическом институте им. П.Н. Лебедева (ФИАНе) — учреждении, основанном его дядей Сергеем Ивановичем Вавиловым, выдающимся физиком, академиком, президентом АН СССР (1945–1951). Во

многом благодаря покровительству своего дяди Ю.Н. Вавилова несмотря на собственное положение сына врага народа удалось получить полноценное образование и заниматься творческими изысканиями в области физики, изучая проблемы космического излучения. В 1987 году он защитил докторскую диссертацию по этой теме.

Начиная с 1950-х — 1960-х годов Ю.Н. Вавилов по совету своих старших коллег по исследованию физических вопросов обратился к систематическому изучению творческого наследия своего отца. Идя по этой дороге, ему посчастливилось выполнить большую полезную работу.

Среди наиболее значимых публикаций сына об отце надо отметить следующие:

- Рядом с Н.И. Вавиловым. Сборник воспоминаний. — М.: «Сов. Россия», 1963. — 222 с. (составитель — Ю.Н. Вавилов); 2-е изд., доп., 1973. — 252 с.
- Вавилов Н.И. «Жизнь коротка, надо спешить». — М.: Сов. Россия, 1990. — 704 с. (составители — Ю.Н. Вавилов, М.Е. Раменская).
- Вавилов Н.И. Документы и фотографии / Сост. Московченко Н.Я., Пятницкий Ю.А., Савина Г.А. — СПб.: Наука, 1995. — 168 с. (Вавилов Ю.Н. — член редколлегии, обладатель архива и активный участник издания).
- Вавилов Н.И. Научное наследие в письмах. Международная переписка. В 6 томах. — М.: Наука, 1994–2003. — Т. I, 1994 — 556 с.; Т. II, 1997. — 638 с.; Т. III, 2000. — 588 с.; Т. IV, 2001. — 324 с.; Т. V, 2002. — 478 с.; Т. VI, 2003. — 328 с. (Ю.Н. Вавилов — член редколлегии и организатор публикаций).
- Николай Иванович Вавилов: Очерки, воспоминания, материалы. — М.: Наука, 1987. — 488 с. (составители — Ю.Н. Вавилов [при участии Е.С. Левиной], В.Д. Есаков).
- Суд палача. Николай Вавилов в застенках НКВД. Биографический очерк. Документы / Составители — Я.Г. Рокитянский, Ю.Н. Вавилов и В.А. Гончаров. — М.: Academia, 1999. — 552 с.
- Вавилов Ю.Н. В долгом поиске. Книга о братьях Николае и Сергее Вавиловых. — М.: ФИАН, 2004. — 330 с.; 2-е изд., доп. и перераб., 2008. — 368 с.
- Вавилов Ю.Н. Братья Вавиловы: жизнь и трагедия // Наука и жизнь. — 2007. — № 1. — С. 84–87.

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым.

- Вавилов Ю.Н. Еще раз об отце: факты из семейного архива. Николай Вавилов за чтением Дарвина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 65–69.
 - Вавилов Ю.Н. Август 1948. Предыстория // Человек. — 1998. — № 1. — С. 104–111.
 - Вавилов Ю.Н. Роль Трофима Лысенко в аресте и гибели Н.И. Вавилова и его ближайших соратников // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. — 2007. — № 5. — С. 15–18.
 - Вавилов Ю.Н., Рокитянский Я.Г. Голгофа. Архивные материалы о последних годах жизни академика Вавилова (1940–1943) // Вестник РАН. — 1993. — Т. 63. — № 9. — С. 830–846.
 - Вавилов Ю.Н., Рокитянский Я.Г. Знания, брошенные в огонь. (Несколько новых страниц из жизни академика Н.И. Вавилова) // Вестник РАН. — 1996. — Т. 66. — № 7. — С. 625–635.
- Есть у него и ряд других биографических статей и интервью, часть которых размещена в Интернете.

Юрий Николаевич входил в состав разных комиссий и редколлежий, которые занимались творчеством Н.И. Вавилова, в том числе наиболее авторитетной Комиссии Академии наук по сохранению и разработке научного наследия Н.И. Вавилова (с 1966 г.). Он был активным участником и организатором практически всех памятных мероприятий в честь своего отца. К его экспертизе и содействию обращались многочисленные лица, проявлявшие интерес к делам и личности выдающегося ученого.

Следует отметить большой такт и личную скромность Ю.Н. Вавилова при участии в действиях, посвященных популяризации заслуг Николая Ивановича. Он никогда себя не выпячивал и соблюдал принципы научной этики, описывая непростые факты отечественной истории 1930–1940-х годов. Вообще он обладал спокойным, рассудительным характером, как и его земляки по матери — саратовцы.

По праву ближайшего родственника ему были открыты все архивы — Государственный архив РФ, Архив Президента РФ (фонд Сталина) и др., из которых он сумел извлечь уникальные документы, свидетельствующие о трагическом пути отца. Сыновья преданность и точность физика-экспериментатора помогли ему выстроить логику изложения драматических событий последних лет жизни Н.И. Вавилова. В этой нише сын смог найти свое незаменимое место и внес значимый вклад в построение здания отечественного вавиловедения, общепризнанный всеми специалистами.

Надо сказать еще о таком факте, как достоверное, почти летописное воспроизведение внутрисемейных событий 1940-х годов, приведенное в воспоминаниях Юрия Николаевича (см. его книгу «В долгом поиске»). Оно помогает воссоздать подлинную историческую канву, связанную с трагедией Н.И. Вавилова.

Деятельность Ю.Н. Вавилова проходила в треугольнике «Ленинград (Санкт-Петербург) — Москва — Саратов»: базовых центрах, где разворачивалась научно-практическая работа Н.И. Вавилова. Везде сын старался присутствовать и в меру сил и возможностей способствовать сохранению и приумножению памяти о своем отце. Многие годы он сотрудничал с Всероссийским институтом растениеводства (ВИР) им. Н.И. Вавилова, часто бывал в своем родном городе и эффективно использовал потенциал ВИРа для точных исторических изысканий (научный хранитель вавиловского кабинета-музея — И.Г. Лоскутов). Был он всегда желанным гостем в московском Институте общей генетики имени Н.И. Вавилова, где есть музей и бережно хранится память об ученом, что в немалой степени обусловлено энтузиазмом сотрудников (хранитель кабинета-музея — Т.Б. Авруцкая). Нередко бывал Юрий Николаевич и в еще одном родном для него городе — Саратове. Он высоко ценил его жителей за почитание отца и особенно отмечал преданность памяти об ученом со стороны куратора музея при Саратовском государственном аграрном университете им. Н.И. Вавилова — В.И. Стукова.



Рис. 1. Вручение ценного дара Ю.Н. Вавиловым (слева) ректору РГАУ члену-корреспонденту РАСХН В.М. Баутину (2007)

Существует еще одна памятная точка, связанная с особым вниманием Ю.Н. Вавилова — это alma mater его отца: «Петровская академия» или «Тимирязевка» — нынешний Российский государственный аграрный университет (РГАУ) — Московская сельскохозяй-

ственная академия им. К.А. Тимирязева. Он постоянно бывал здесь, особенно на юбилейных торжествах, посвященных Н.И. Вавилову. Одно из таких мероприятий состоялось в ноябре 2007 года по случаю 120-летия со дня рождения Н.И. Вавилова, на котором Юрий Николаевич был удостоен звания почетного доктора РГАУ. В свою очередь, он тогда подарил университету семейную реликвию, редкую книгу из личной библиотеки его знаменитого выпускника: дореволюционное издание (1910) дипломной работы Н.И. Вавилова «Голье слизни (улитки), повреждающие поля и огороды в Московской губернии» — этот момент запечатлен на снимке (рис. 1).

Не менее важной была международная активность Ю.Н. Вавилова. Ученые и общественные деятели Великобритании, США и других стран принимали его, оказывали помощь в сборе информации об универсальном русском ученом — растениеводе, генетике, селекционере, географе. Это объясняется тем глобальным вкладом, который внес Н.И. Вавилов в создание мировой коллекции растений, основание теории происхождения культурных растений (семь мировых центров формообразования), а также его личными связями с научными знаменитостями (Бэтсон, Морган, Меллер и др.).

Имеется также существенный раздел в деятельности Ю.Н. Вавилова — это обращение к исторической памяти о своем дяде Сергее Ивановиче Вавилове, необычайном человеке, обладателе энциклопедических знаний, проделавшем большой труд по реконструкции правдивой информации о судьбе своего брата и обеспечившим благоприятствование жизненному пути племянника. Юрий Николаевич, помимо ряда ценных публикаций о нем, оплатил ему изданием уникального собственного произведения «В долгом поиске. Книга о братьях Николае и Сергее Вавиловых», где изложил свое мнение о суммарном вкладе братьев Вавиловых в науку XX века и значительно расширил сведения о ключевых фактах из жизни этих незаурядных личностей беспристрастным взглядом изнутри их семьи. По-видимому, не зря сохранилась в архивах прекрасная фотография Юрия Николаевича, где он бережно укладывает в карман фотографии дорогого ему по крови и духу человека. Обычно он выглядит сдержанным на всех фотографиях, а тут в контексте темы С.И. Вавилова он светится от искренних чувств (рис. 2).

Заслуги Ю.Н. Вавилова были отмечены званиями почетного профессора Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова и почетного доктора РГАУ — Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева. Он был награжден

медалью имени Н.И. Вавилова Российской академии естествознания и другими знаками отличия.



Рис. 2. Ю.Н. Вавилов во время обсуждения темы о своем дяде

Благодаря сотрудничеству и личной дружбе с Юрием Николаевичем наш журнал на протяжении 15 лет постоянно обращался к вавиловской теме. Именно это способствовало появлению на его страницах приуроченных к знаменательным датам специальных тематических статей, в их числе, например: Воробьев В.С. К 95-летию открытия Н.И. Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 1. — С. 39–43; Воробьев В.С., Воробьева О.В. Вавилов и Бэтсон — ученик и учитель: новые исторические находки. К 120-летию со дня рождения Н.И. Вавилова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 53–64.

Юбилеи, посвященные ученому, торжественные мероприятия в его честь (конференции, открытие памятников, мемориальных досок, вручение премий и т.д.) — все это тщательно отслеживалось и находило всяческую поддержку журнала. В контексте этого направления деятельности были напечатаны материалы об учителе Н.И. Вавилова — Бэтсоне (о его книге «Problems of genetics», 1913): Воробьев В.С. К 100-летию выхода в свет книги У. Бэтсона «Проблемы генетики» // Вестник биотехнологии... — 2013. — Т. 9. — № 3. — С. 81–91. Регулярно публиковалась научная хроника о Н.И. Вавилове. Сам Юрий Николаевич напечатал в нашем журнале крайне интересную статью о заметках отца при изучении трудов Дарвина (см. выше).

В целом редколлегия журнала своевременно реагировала на памятные даты или мемориальные мероприятия, связанные с Н.И. Вавиловым, помещением соответствующих информационных материалов. Так, в 2004 году была опубликована рецензия на книгу Ю.Н. Вавилова «В долгом поиске» (Воробьев В. «Братья Вавиловы — титаны XX века», Медгазета, 2004, 23 июня, № 47, с. 15). В 2006 г. был напечатан материал об открытии мемориальной доски братьям Вавиловым на здании бывшего Коммерческого училища, где они учились (Воробьева О.В. «Увековечение памяти братьев Вавиловых» // Вестник биотехнологии..., 2006, Т. 2, № 1, с. 81–82). Наконец, в 2007 г. в «Вестнике биотехнологии ...» вышла в свет подборка материалов к 120-летию со дня рождения Н.И. Вавилова (Т. 3, № 4, с. 76–77).

В последние годы своей жизни Юрий Николаевич сильно переживал появление в РФ очагов критики Н.И. Вавилова и соответственно восхваления Т.Д. Лысенко, включая публикации в СМИ и дискуссии в научной среде о неолысенкоизме. Пытался он выяснить и обстоятельства гибели своего брата Олега в 1946 году во время альпинистских восхождений в горах Кавказа, недалеко от Теберды; при этом он стремился найти безупречные факты, подтверждающие неслучайность данного события.

Ю.Н. Вавилов бережно сохранял в своей семье бесценные отцовские реликвии и в последние годы жизни постепенно передал их в распоряжение государственных архивов.

Перед своей кончиной он полностью утратил зрение, но хранил присутствие духа и интерес к жизни.

Редколлегия и редсовет журнала выражают родным и близким покойного соболезнование в связи с утратой этого замечательного человека.

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018 (Уфа, 13–17 июня 2018 г.)

В Институте биохимии и генетики УФИЦ РАН с 13 по 17 июня 2018 года прошла Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018.

Организаторы конференции: Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфимский

Институт биологии РАН, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Башкирский государственный университет, Академия наук Республики Башкортостан.

Научные направления: 1) Биотехнология растений. 2) Биотехнология микроорганизмов. 3) Симбиозы растений с микроорганизмами, биотехнологии симбиотических систем.

Цель конференции — объединение научных школ, работающих в области биотехнологии растений и микроорганизмов, обмен идеями и подходами к изучению и модификации геномов растений и микроорганизмов.

В состав программного комитета конференции входили академик, президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Тихонович И.А. (председатель), профессора Проворов Н.А., Цегелев С.Ю., Хлесткина Е.К.

В работе конференции участвовало свыше 250 специалистов из России (32 субъекта РФ) и стран ближнего и дальнего зарубежья. В ходе конференции были сделаны 38 пленарных докладов и 85 секционных докладов. Работали три секции. В секции «Биотехнология растений» основное внимание было уделено культуре клеток и тканей высших растений *in vitro*, микрклональному размножению растений, современным методам селекции, генетической инженерии и геномному редактированию растений; агробактериальной, биобаллистической трансформации растений и другим аналогичным методам, биоинформатике растений, роли растений в биоремедиации почв и аквасистем. В рамках секции «Биотехнология микроорганизмов» были обсуждены вопросы: создание биопрепаратов для растений на основе микроорганизмов, современные методы селекции и геномное редактирование бактерий, биоразнообразие, систематика и эволюция микроорганизмов, метагеномика почвенных микробных сообществ. Секция «Симбиозы растений с микроорганизмами, биотехнологии симбиотических систем» была посвящена вопросам бобово-ризобияльного симбиоза; актиноризобияльного симбиоза; арбускулярной микоризы; синцианозов; ассоциативных симбиозов растений и микроорганизмов, биотехнологии искусственных симбиотических систем, экобиотехнологии с применением микроорганизмов и растений, микробиомам ризосферных и эндофитных сообществ в растительно-микробных симбиозах, а также биотехнологии защиты растений. По материалам конференции издан сборник докладов.

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 рубрикации, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

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



Подписано к печати 27.06.18
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