



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBIRIAN FEDERAL UNIVERSITY

БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ – ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА – КАЧЕСТВО ЖИЗНИ

Материалы IV Международной научной конференции

BIOTECHNOLOGY OF NEW MATERIALS – ENVIRONMENT – QUALITY OF LIFE

Proceedings of the IV International Scientific Conference



Красноярск
СФУ
2021

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Сибирский федеральный университет

**БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ –
ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА – КАЧЕСТВО ЖИЗНИ**

Материалы IV Международной научной конференции

Красноярск, 10–13 октября 2021 г.

Электронное издание

Красноярск
СФУ
2021

Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation
Siberian Federal University

**BIOTECHNOLOGY OF NEW MATERIALS –
ENVIRONMENT – QUALITY OF LIFE**

Proceedings of the IV International Scientific Conference

Krasnoyarsk, October 10–13, 2021

Electronic publication

Krasnoyarsk
SibFU
2021

УДК 602(08)
ББК 28.087.1я43+30.16я43
Б637

Ответственный за выпуск:
Суковатый Алексей Григорьевич, кандидат физико-математических наук

Б637 Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни : материалы IV Междунар. науч. конф., г. Красноярск, 10–13 октября 2021 г. / отв. за вып. : А. Г. Суковатый. – Электрон. дан. (7,74 Мб). – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2021. – 1 электрон. опт. диск. (CD-ROM). – Систем. требования : PC не ниже класса Pentium I ; 128 Mb Ram ; Windows 98/XP/7 ; Adobe Reader V8.0 и выше. – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-7638-4564-8

Представлены Материалы IV Международной научной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни». Включает статьи разделов «Полимеры и полимерные изделия (процессинг)», «Полимерные композиты», «Применение новых материалов для повышения качества жизни и защиты окружающей среды».

Предназначены для специалистов в области биотехнологии, нанотехнологий, новых материалов, экологии.

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Никакая часть настоящего издания ни в каких целях и ни в какой форме не может быть воспроизведена с использованием каких-либо средств (механических, электронных, фотокопирования, записи на магнитные носители) без письменного разрешения авторов. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Конференция проведена в рамках реализации Программы повышения конкурентоспособности СФУ и мегагранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» – соглашения № 075-15-2021-626 (конкурс для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских вузах и научных организациях по Постановлению правительства РФ от 9 апреля 2010 года № 220; VI очередь).

Электронный вариант издания
см.: <http://catalog.sfu-kras.ru>

УДК 602(08)
ББК 28.087.1я43+30.16я43

Электронное научное издание

Компьютерная вёрстка *Е. А. Сафиной*

Подписано в свет 16.09.2021. Заказ № 14386
Тиражируется на машиночитаемых носителях

Библиотечно-издательский комплекс
Сибирского федерального университета
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 82а
Тел. (391) 206-26-16; <http://bik.sfu-kras.ru>
E-mail: publishing_house@sfu-kras.ru

ISBN 978-5-7638-4564-8

© Сибирский федеральный
университет, 2021

UDC 602(08)
LBC 28.087.1я43+30.16я43
Б637

Responsible for publication:

Alexey Grigoryevich Sukovatyi, candidate of physical and mathematical sciences

Б637 Biotechnology of new materials – environment – quality of life : Proceedings of the IV International Scientific Conference. Krasnoyarsk, October 10–13, 2021 / Responsible for publication: A. G. Sukovatyi. – Electronic data (7,74 Mb). – Krasnoyarsk : Siberian Federal University, 2021. – Electronic optical disk (CD-ROM). – System requirements : PC not below class Pentium I ; 128 Mb Ram ; Windows 98/XP/7 ; Adobe Reader v 8.0 and above. – Screen title.

ISBN 978-5-7638-4564-8

The materials of the IV International Scientific Conference "Biotechnology of new materials – environment – quality of life" are presented. It includes articles in the sections "Polymers and polymer products (processing)", "Polymer composites", "The use of new materials to improve the quality of life and protect the environment".

The edition is aimed at specialists in the field of biotechnology, nanotechnology, new materials, and ecology.

The content of the resource is protected by copyright law. No part of this publication, for any purpose, and in any form may not be reproduced using any means (mechanical, electronic, photocopying, recording on magnetic media) without the written permission of the authors. The names of software, products, devices or systems that appear may be registered trademarks of certain companies.

The conference was financially supported by Project "Agropreparations of the new generation: a strategy of construction and realization" in accordance agreement № 075-15-2021-626 (with Resolution № 220-VI of the Government of the Russian Federation of April 9, 2010, "On measures designed to attract leading scientists to the Russian institutions of higher learning).

Digital version of the publication is available at:
<http://catalog.sfu-kras.ru>

UDC 602(08)
LBC 28.087.1я43+30.16я43

Electronic scientific publication

Computer layout by *E. A. Safina*

Signed into the world 16.09.2021. Order number 14386

It is replicated on machine-readable media

Siberian Federal University Publishing House

660041, Krasnoyarsk, Svobodny avenue, 82a

Tel. (391) 206-26-16; <http://bik.sfu-kras.ru>

E-mail: publishing_house@sfu-kras.ru

ISBN 978-5-7638-4564-8

© Siberian Federal
University, 2021



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

РАЗДЕЛ 1. ПОЛИМЕРЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ ИЗДЕЛИЯ (ПРОЦЕССИНГ)



Prof. Alain Dufresne

Grenoble INP-Pagora is the Graduate School of Engineering in Paper, Print Media and Biomaterials, France

E-mail: alain.dufresne@pagora.grenoble-inp.fr

Alain Dufresne is currently Professor at The International School of Paper, Print Media and Biomaterials (Pagora) at Grenoble Institute of Technology, Grenoble, France. He obtained a PhD in Electronics from the National Institute of Applied Sciences at Toulouse, France and he has already Masters in Chemical Engineering from Ecole Polytechnique de Montreal and in Solid State Physics from Paul Sabatier University, Toulouse. He is an expert on polysaccharide nanofibrils and nanocrystals (cellulose, chitin, starch), on processing and characterization of nanocomposites based on renewable resources and on valorization of the biomass.

BIOBASED NANOMATERIALS AND POLYMER NANOCOMPOSITES

Alain Dufresne

*Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, LGP2, F-38000 Grenoble, France
E-mail: alain.dufresne@pagora.grenoble-inp.fr*

Unexpected and attractive properties can be observed when decreasing the size of a material down to the nanoscale. Cellulose and other polysaccharides (starch, chitin) are no exception to the rule. These materials are abundant, renewable, non-toxic, low density and biodegradable. In the nanoscale, some properties such as mechanical properties and surface reactivity are exacerbated. Cellulose nanomaterials are therefore promising candidates for the preparation of bionanocomposites and other nanodevices.

Although cellulose is the most available natural polymer on Earth, it is only recently that it has gained importance as a nanostructured material thanks to its hierarchical structure. Cellulosic nanomaterials are generally in the form of cellulose nanofibrils (CNF) or cellulose nanocrystals (CNC). Intense mechanical shear applied to the cellulosic fibers, thus liberating more or less individually the nanofibrils, is generally used to obtain CNFs in the form of flexible filaments. The mechanical process used and the source of cellulose both condition the diameter of CNF, generally between 2 and 100 nm.

The length is more difficult to determine but is generally in the range of the micrometer. A controlled hydrolysis treatment with a strong acid can be applied to cellulosic fibers allowing dissolution of the amorphous domains of cellulose and obtaining CNC. This material consists of nanoparticles in the form of rigid needles that can be considered as a cellulose crystal without apparent defects. The precise physical dimensions of the nanocrystal depend on several factors, including the source of the cellulose used and the conditions of hydrolysis. The length is generally of the order of a few hundred nanometers and the width of the order of a few nanometers. These two nanomaterials are obtained in the form of dilute stable aqueous dispersions.

The mechanical modulus of crystalline cellulose is the basis of many potential applications. Moreover, the low thermal expansion coefficient caused by the high crystallinity of cellulose nanomaterials and high transparency without the presence of any existing polymer is highly advantageous for flexible display panels and electronic devices. For papermaking, in addition of improving the tensile strength, burst strength, tear, density, smoothness and also increasing the air permeability, the capacity of retaining the filler and the adsorption of a dye are also improved by the nanoparticles. Besides, the inherent high reactivity of cellulose and the pervasive surface hydroxyl groups associated with the nanoscale dimensions of cellulose nanomaterials open up opportunities to develop new functional nanomaterials.

With a Young's modulus of the order of 100-130 GPa and a specific surface of several hundred $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, these cellulosic nanomaterials have a significant capacity of reinforcement at low filler content. However, as for any nanoparticle, the main challenge is related to their homogeneous dispersion in a polymer matrix. A major challenge is to prepare polymeric nanocomposites using industrial techniques such as melt processing, thus avoiding liquid methods.



Prof. Fernando Gomes de Souza Júnior

*Laboratório de Biopolímeros
e Sensores /LaBioS Centro de Tecnologia –
Cidade Universitária, Brasília*

E-mail: fernando_gomes@ima.ufrj.br

Prof. Gomes is graduated in Chemistry in the Federal University of Espírito Santo (1999), Master in Engineering and Materials Science by the State University of Norte Fluminense Darcy Ribeiro (2002), D.Sc. in Polymer Science and Technology by the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ 2006) and Post-Doctorate by the Chemical Engineering Program /COPPE/UFRJ. He is currently Associate Professor III of the Institute of Macromolecules at UFRJ and Full Professor of the Nanotechnology Engineering Program at COPPE/UFRJ since 2019. Prof. Gomes received the Chair Professorship on Nanoscience and Nanotechnology award from Mahatma Gandhi University - India (2018). Prof. Gomes is a member of the editorial board of Current Applied Polymer Science (ISSN 2452-2716) since 2016 and Editor-in-Chief since 2020, Associate Editor of MedCrave Online Journal (MOJ) Polymer Science (ISSN: 2574-9773) since 2017, Honorable Editor of the Academic Journal of Polymer Science, since 2018 and Editorial board member of the Composite Interfaces (ISSN: 1568-5543) since 2021. Prof. Gomes works mainly with polymeric nanocomposites obtained from renewable resources in three lines: (I) Environmental recovery; (II) Human health; and (III) Sensors.

This talk will focus on the activities developed by the Biopolymers and Sensors Lab from the Federal University of Rio de Janeiro/Brazil over the last decade. The main subjects are the synthesis of biopolymers, the characterization of these materials, as well as the most diverse applications, from the field of sensors to human health.

BIOPOLYMERS AND SENSORS LAB EFFORTS TO SPREAD UP THE USE OF BIOPOLYMERS

Prof. Fernando Gomes de Souza Júnior

Biopolymers are widely available resources that have been part of human beings' daily lives since the dawn of humanity. These materials are present in various forms, from plant fibers, such as curaua, to a series of proteins, including the spider web. Besides that, biopolymers are sources of energy such as, for example, the case of starch. Biopolymers are also of crucial importance in structural applications. For instance, several constructions are still made of wood. Despite the diversity, natural variations in the production sources lead

to obtaining materials with different properties. Thus, seasonality is a significant challenge. With the advent of the Industrial and Petrochemical Revolution, new synthetic materials were prepared, enabling a real paradigm shift for human existence. Many new features were invented, allowing the construction of tools and even complex systems. These polymeric materials from petrochemical sources have the most diverse chemical compositions, which allow their use in many applications. Thus, these materials became part of our daily lives. These materials surround us, and we could not live without them. However, the irresponsible use of these resources has produced an unprecedented environmental catastrophe. Given the non-biodegradable nature of these conventional polymeric materials, their inappropriate disposal has terrible consequences for planet Earth. Nowadays, it is indisputable that the accumulation of these materials harms the species, regardless of their habitat. It is easy to see that our seas are contaminated, that our soil is contaminated, that our air is contaminated, and unfortunately, even space has already been contaminated by anthropogenic activities that result in the inappropriate disposal of polymeric materials. Therefore, our generation is committed to tirelessly looking for ways to recover our planet, allowing us to deliver it recovered to future generations. We do not want to give up our lifestyle. On the other hand, we must compromise.

Among the possibilities available, replacing these resources from petrochemical sources should be a priority. For this, the use of Bioengineering and Genetic Engineering has allowed us to achieve Results previously unimaginable. Among them, obtaining versatile monomers capable of being transformed into other monomers and which have a little production cost are the watchwords for this moment. These new biotechnological routes make it possible to produce new materials that are fully capable of replacing analogs from petrochemical sources. Another alternative is the use of natural Biopolymeric structures as a substrate for the most diverse applications. This alternative allows us to reduce the number of petrochemical polymers in several applications drastically. Another way to spread the use of these materials based on biopolymers is to add value to them. One of the best ways to add value to these materials is via nanomodification. The insertion of nanoparticles in the middle of this polymeric mass allows different physical properties to be obtained, which allow these materials to be used in different applications from the farm to human health. In this context, the primary function of the Biopolymers and Sensors Laboratory is to disseminate the use of materials from renewable sources [1–64].

The primary objective of Biopolymers and Sensors Lab is developing the synthesis, and characterization of different biopolymers systems, always pursuing impart new properties to these materials. These materials are based on cellulose, lignin, succinic acid, and glycerin. They were nanomodified, allowing their use in a myriad of applications. For instance, our group developed mango (*Mangifera indica* L.) fibers modified with polyaniline (PAni) [60].

The obtained materials were characterized through Wide-angle X-ray scattering (WAXS), Scanning electron microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis). The electrical resistivity and magnetic behavior of the obtained samples were evaluated with the help of standard volume resistivity measurements and magnetic force tests. The materials presented excellent electrical and magnetic properties. For instance, in the best case, fibers modified with PANi are approximately 120,000 times more conductive than raw mango fibers. Besides, mango fibers modified with PANi were increasingly attracted by the magnetic field, presenting magnetic force and magnetic susceptibility equal to (6.69 ± 0.05) mN/g (at 872 ± 4 Gauss) and $(2.48 \pm 0.04) \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ Kg}^{-1}$, respectively. As a consequence, modification of mango fibers with PANi constitutes a very promising procedure for the manufacture of green magnetic devices.

In another work, our group presented a smart composite prepared using a resin-based on cardanol and furfural, filled with Al₂O₃. This material is inert at room temperature. However, it can release an acid active after a specific temperature is reached [65]. The obtained materials were characterized by FTIR, XRD, SEM, Thermal gravimetric analysis (TGA), and Differential scanning calorimetry (DSC). Besides, cure degree and acid release tests were performed. Results proved the acid is trapped inside the composites, remaining inactive in the structure while the melting temperature of the hydrophobic shell is not reached. After this, acid is released, and pH decreases. Therefore, the presented composite could be useful to speed up the drilling in sedimentary rocks by combining chemical (acid release) and physical (mechanical wear) mechanisms.

Regarding Human treatment systems, poly (butylene succinate) (PBS) biodegradable polyester – was modified using rutin as a natural chain extender [6]. Even though castor oil is a more efficient chain extender, the use of small rutin (1 wt%) produced an increase in the viscosity of around 100% of PBS. The molecular weight increased by 36%, and the crystallinity presented a reduction of 7%. Besides, the polymer-modified with rutin was tested as a silybin release system. The material extended using rutin was able to reduce the release of silybin compared to the one from PBS at 25.7%. In this same field, our group also presented the preparation of a hyperthermic agent by the direct modification of magnetic nanoparticles via grafting of an aliphatic polyester model, the low molecular weight poly(lactic acid), PLA [43]. This grafting was carried out in dispersion, where particles modified with lactic acid were grafted to the PLA using an aromatic diisocyanate. The prepared materials were studied by several techniques, such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), small-angle X-ray scattering (SAXS), thermogravimetric analysis (TGA), and magnetic force. The Results showed that the synthesis and modification of nanoparticles were performed successfully and that the obtained products presented magnetic force values able to make them useful in biomedical applications, such as magnetic hyperthermia. In this sense, the prepared materials heated using 200 A and 300 A presented Specific Ab-

sorption Rate equal to 1254 and 3762 W/kg, respectively. In other words, 20 mg/mL dispersions of these nanomaterials, heated using 200 A and 300 A, can increase the temperature between 39 and 69 °C, respectively. Thus, tested media achieved temperatures which can induce tumor cell death, constituting an attractive alternative in the fight against cancer. Therefore, besides the low cost and ease of production, the materials produced here present encouraging Results, which may allow their future use in cancer therapy.

Finally, aiming to solve the lost circulation fluid control, our group described the one- step production of glycerin-based polyurethane/magnetite nanocomposites. The polymerization was performed in a nonaqueous dispersion containing the magnetic nanoparticles and the polar monomers under the alternating magnetic field [48]. Fourier transform infrared spectroscopy and crosslink degree tests were useful to conclude that the use of magnetic induction (~3 min at 9300 W) produced Results similar to those obtained by the conventional polymerization (~3 h at 80 °C) in a fraction of the required time. A lost circulation fluid control test also was performed under magnetic induction heating, and the system containing 5 wt% of the nanoparticles showed the highest reduction of the fluid flow rate. Scanning electron microscopy and Probability density function tests of the best material allowed inferring that composite prepared by magnetic induction presents a non-Gaussian distribution of the diameter directly related to the observed sealing effect. These Results showed that the proposed polymer/polymerization system could be advantageous to the sealing applications.

In summary, over the last decade, we have developed a series of new materials based on renewable sources, which have proven to be useful tools for solving the most varied problems. Among them, the environmental recovery focused on bioremediation [28] and oil spill clean up tools [23, 25–27, 30, 38, 39, 47, 49, 50, 64]. In turn, the use of biopolymers as drug delivery systems also was intensely pursued [3, 7, 8, 34, 35, 41, 66, 67]. Also, the use of green materials as sensing devices deserves to be highlighted [37, 45, 56, 63]. This approach allows us to focus concomitantly on the intrinsic needs of our planet and our species, integrating quality of life and environmental preservation, which are fundamental for the well- being of all future generations that will populate our world.

Acknowledgements

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP PRESAL Ref.1889/10) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) for the financial support and scholarships.

References

1. Aboelkheir MG, Visconte LY, Oliveira GE, et al. (2019) The biodegradative effect of *Tenebrio molitor* Linnaeus larvae on vulcanized SBR and tire crumb. *Sci Total Environ* 649:1075–1082. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.228>
2. Neto W, Peña L, Ferreira G, et al. (2016) Target Delivery from Modified Polymers to Cancer Treatment. *Curr Org Chem* 20:1–17. <https://doi.org/10.2174/1385272820666160510151442>
3. Pereira ED, Souza Jr. FG, Pinto JCCS, et al. (2014) Synthesis, Characterization and Drug Delivery Profile of Magnetic PLGA-PEG-PLGA/Maghemite Nanocomposite. *Macromol Symp* 343:18–25. <https://doi.org/10.1002/masy.201300168>
4. Ferreira LP, Moreira AN, Pinto JC, Souza Jr. FG (2015) Synthesis of poly(butylene succinate) using metal catalysts. *Polym Eng Sci* 55:1889–1896. <https://doi.org/10.1002/pen.24029>
5. Moraes RS, Ricardo NS, Saez V, Souza Jr. FG (2018) Synthesis of magnetic composite of poly (butylene succinate) and magnetite for the controlled release of meloxicam. *MOJ Polym Sci* 2:39–42. <https://doi.org/10.15406/mojps.2018.02.00044>
6. Ferreira LP, da Cunha BP, Kuster RM, et al. (2017) Synthesis and chemical modification of poly(butylene succinate) with rutin useful to the release of silybin. *Ind Crops Prod* 97:599–611. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.064>
7. Sá L, Viçosa A, Rocha S, Souza Junior FG (2017) Synthesis and characterization of poly (butylene succinate)-g-poly (vinyl acetate) as ibuprofen drug delivery system. *Curr Appl Polym Sci* 01: <https://doi.org/10.2174/2452271601666170620125607>
8. Ramon J, Saez V, Souza Jr. FG, et al. (2018) Synthesis and Characterization of PEG-PBS Copolymers to Obtain Microspheres With Different Naproxen Release Profiles. *Macromol Symp* 380:1800065. <https://doi.org/10.1002/masy.201800065>
9. Péres EUX, Sousa MH, Souza Jr. FG, et al. (2017) Synthesis and characterization of a new biobased poly(urethane-ester) from ricinoleic acid and its use as biopolymeric matrix for magnetic nanocomposites: Biopolymer as matrix for magnetic nanocomposites. *Eur J Lipid Sci Technol* 1600451. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600451>
10. Icart LP, Jr FG de S, Lima LMTR (2019) Sustained release and pharmacologic evaluation of human glucagon-like peptide-1 and liraglutide from polymeric microparticles. *J Microencapsul* 36:747–758. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1677795>
11. Neto WS, Dutra GVS, Jensen AT, et al. (2018) Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating. *J Alloys Compd* 739:1025–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.12.338>
12. Marques FD, Nele de Souza M, Souza Jr. FG (2017) Sealing system activated by magnetic induction polymerization. *J Appl Polym Sci* 134:45549. <https://doi.org/10.1002/app.45549>
13. Saez V, Cerruti R, Ramón JA, et al. (2016) Quantification of Oxaliplatin Encapsulated into PLGA Microspheres by TGA. *Macromol Symp* 368:116–121. <https://doi.org/10.1002/masy.201500181>
14. Pérez DD, Souza Jr. FG (2018) Protein Release Systems for Bone Regeneration. *Res Dev Mater Sci* 5:1–6. <https://doi.org/10.31031/RDMS.2018.05.000625>
15. Besteti MD, Souza Jr. FG, Freire DMG, Pinto JC (2014) Production of core-shell polymer particles-containing cardanol by semibatch combined suspension/emulsion polymerization. *Polym Eng Sci* 54:1222–1229. <https://doi.org/10.1002/pen.23660>
16. Ferreira LP, Moreira AN, Souza Jr. FG, Pinto JCC da S (2014) Preparation of nanocomposites based on poly(Butylene Succinate) and montmorillonite organoclay via in situ polymerization. *Polímeros* 24:604–611. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1662>
17. Souza Jr. FG, Soares D, Freitas R, et al. (2017) Praziquantel Release Systems Based on Poly(Butylene Succinate) / Polyethylene Glycol Nanocomposites. *Curr Appl Polym Sci* 1:1–7. <https://doi.org/10.2174/2452271601666160922163508>

18. da Costa VC, de Souza Pinto GL, Nascimento MVF, et al. (2018) Poly (Butylene Succinate)-g-Poly(Hydroxypropyl Methacrylate) as a New Meloxicam Delivery System. *Macromol Symp* 380:1800109. <https://doi.org/10.1002/masy.201800109>
19. Pérez DD, Silva J, Fernandes E, et al. (2017) Poly (Butylene Succinate) Scaffolds Prepared by Leaching. *MOJ Polym Sci* 1:. <https://doi.org/10.15406/mojps.2017.01.00035>
20. Borges GR, Aboelkheir MG, de Souza Junior FG, et al. (2020) Poly (butylene succinate) and derivative copolymer filled with *Dendranthema grandiflora* biolarvicide extract. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08679-3>
21. Icart L, Souza Jr FG (2016) PLA-b-PEG/magnetite hyperthermic agent prepared by ugi four component condensation. *Express Polym Lett* 188–203. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.18>
22. Marinho V, Lima N, Neves MA, Souza Jr. FG (2018) Petroleum Sorbers Based on Renewable Alkyd Resin and Lignin. *Macromol Symp* 380:1800116. <https://doi.org/10.1002/masy.201800116>
23. Ferreira LP, Moreira AN, Delazare T, et al. (2012) Petroleum Absorbers Based on CNSL, Furfural and Lignin – The Effect of the Chemical Similarity on the Interactions among Petroleum and Bioresins. *Macromol Symp* 319:210–221. <https://doi.org/10.1002/masy.201100145>
24. Peña Icart L, Fernandes dos Santos E, Agüero Luztonó L, et al. (2018) Paclitaxel-Loaded PLA/PEG/Magnetite Anticancer and Hyperthermic Agent Prepared From Materials Obtained by the Ugi's Multicomponent Reaction. *Macromol Symp* 380:1800094. <https://doi.org/10.1002/masy.201800094>
25. Elias E, Costa R, Marques F, et al. (2015) Oil-spill cleanup: The influence of acetylated curaua fibers on the oil-removal capability of magnetic composites. *J Appl Polym Sci* 132:41732–41740. <https://doi.org/10.1002/app.41732>
26. Silva JC, Oliveira GE, Toledo Filho RD, Souza Jr. FG (2018) Oil Spill Clean-Up Tool Based on Castor Oil and Coffee Grounds Magnetic Resins. *Macromol Symp* 380:1800095. <https://doi.org/10.1002/masy.201800095>
27. Marques FD, Souza Jr. FG, Oliveira GE (2016) Oil sorbers based on renewable sources and coffee grounds. *J Appl Polym Sci* 133:43127–43134. <https://doi.org/10.1002/app.43127>
28. Caetano RMJ, Bedor PBA, de Jesus EFO, et al. (2018) Oil Biodegradation Systems Based on γ Irradiated Poly (Butylene Succinate). *Macromol Symp* 380:1800123. <https://doi.org/10.1002/masy.201800123>
29. Souza Jr. FG, Pinto JC, Rodrigues MV, et al. (2008) New polyaniline/polycardanol conductive blends characterized by FTIR, NIR, and XPS. *Polym Eng Sci* 48:1947–1952. <https://doi.org/10.1002/pen.21047>
30. Grance EGO, Souza Jr. FG, Varela A, et al. (2012) New petroleum absorbers based on lignin – CNSL–formol magnetic nanocomposites. *J Appl Polym Sci* 126:E305–E312. <https://doi.org/10.1002/app.36998>
31. Varela A, Oliveira G, Souza Jr. FG, et al. (2013) New petroleum absorbers based on cardanol-furfuraldehyde magnetic nanocomposites. *Polym Eng Sci* 53:44–51. <https://doi.org/10.1002/pen.23229>
32. Souza Jr. FG, Richa P, de Siervo A, et al. (2008) New in situ Blends of Polyaniline and Cardanol Bio-Resins. *Macromol Mater Eng* 293:675–683. <https://doi.org/10.1002/mame.200800077>
33. Souza Jr FG, Oliveira GE, Rodrigues CHM, et al. (2009) Natural Brazilian Amazonic (Curauá) Fibers Modified with Polyaniline Nanoparticles. *Macromol Mater Eng* 294:484–491. <https://doi.org/10.1002/mame.200900033>
34. Vargas A, Souza Jr. FG (2011) Nanocomposites of Poly(L-Lactic Acid) and Maghemite for Drug Delivery of Caffeine. In: Narayan R, Bandyopadhyay A, Bose S (eds)

Biomaterials Science - Processing, Properties, and Applications. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 95–105

35. Lange J, Souza Jr. FG, Nele M, et al. (2015) Molecular Dynamic Simulation of Oxaliplatin Diffusion in Poly(lactic acid-co-glycolic acid). Part A: Parameterization and Validation of the Force-Field CVFF. *Macromol Theory Simul* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mats.201500049>

36. Souza Jr FG, Carlos Pinto J, Alves Garcia F, et al. (2014) Modification of coconut fibers with polyaniline for manufacture of pressure-sensitive devices. *Polym Eng Sci* 54:2887–2895. <https://doi.org/10.1002/pen.23845>

37. Souza Jr FG, Paiva LO, Michel RC, de Oliveira GE (2011) Modificação da fibra de coco com polianilina e o seu uso como sensor de pressão. *Polímeros* 21:39–46. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000016>

38. Oliveira GE, Souza Jr FG, Lopes MC (2012) Magnetic Biofoams Based on Polyurethane Applied in Oil Spill Cleanup Processes - Chapter 23. In: *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs - CRC Press Book*, 1st ed. Apple Academic Press, Inc., 1613 Beaver Dam Road, Suite 104 Point Pleasant, NJ 08742 USA, p 370

39. Varela, A.; Lopes, M. C.; Delazare, T.; Oliveira GE, Souza Jr FG (2012) Magnetic and green resins useful to oil spill cleanup. In: *Nova Science Publishers I (ed) Oil: Production, Consumption and Environmental Impact*. Shuangning Xiu, New York, p 7

40. Pereira ED, Cerruti R, Fernandes E, et al. (2016) Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros*. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2323>

41. Pereira ED, Souza FG, Santana CI, et al. (2013) Influence of magnetic field on the dissolution profile of cotrimoxazole inserted into poly(lactic acid-co-glycolic acid) and maghemite nanocomposites. *Polym Eng Sci* 53:2308–2317. <https://doi.org/10.1002/pen.23606>

42. Santos RD, Ferreira SR, Oliveira GE, et al. (2018) Influence of Alkaline Hornification Treatment Cycles on the Mechanical Behavior in Curaua Fibers. *Macromol Symp* 381:1800096. <https://doi.org/10.1002/masy.201800096>

43. de Araújo Segura TC, Pereira ED, Icart LP, et al. (2018) Hyperthermic Agent Prepared by One-Pot Modification of Maghemite Using an Aliphatic Polyester Model. *Polym Sci Ser B* 60:806–815. <https://doi.org/10.1134/S1560090418060106>

44. Moraes RS, Saez V, Hernandez JAR, Souza Jr. FG (2018) Hyperthermia System Based on Extrinsicly Magnetic Poly (Butylene Succinate). *Macromol Symp* 381:1800108. <https://doi.org/10.1002/masy.201800108>

45. de Almeida TM, da Silveira Maranhão F, de Carvalho FV, et al. (2018) H₂S Sensing Material Based on Cotton Fabrics Modified with Polyaniline. *Macromol Symp* 381:1800111. <https://doi.org/10.1002/masy.201800111>

46. Perez DD, de Souza FG (2018) Growing Use of Conventional Methods for Preparation of Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Curr Appl Polym Sci* 1: <https://doi.org/10.2174/2452271601666170922161611>

47. Costa RMD da, Hungerbühler G, Saraiva T, et al. (2017) Green polyurethane synthesis by emulsion technique: a magnetic composite for oil spill removal. *Polímeros* 27:273–279. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2397>

48. Santiago JP, de Campos Silva P, Marques FD, Souza Jr. FG (2018) Glycerin-Based Polyurethane Obtained by Inverse Emulsion: Comparison Between Magnetic Induction and Conventional Heating. *Macromol Symp* 380:1800091. <https://doi.org/10.1002/masy.201800091>

49. Figueiredo AS, Icart LP, Marques FD, et al. (2019) Extrinsicly magnetic poly(butylene succinate): An up-and-coming petroleum cleanup tool. *Sci Total Environ* 647:88–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.421>

50. Lopes MC, Marques F, Souza Jr. FG, Oliveira GE (2018) Experimental Design Optimization of Castor Oil, Phthalic Anhydride, and Glycerin Magnetic Nanocomposites Useful as Oil Spill Cleanup Tool. *Macromol Symp* 380:1800085. <https://doi.org/10.1002/masy.201800085>
51. Souza Jr. FG, Picciani PH, Rocha EV, Oliveira GE (2010) Estudo das propriedades mecânicas e elétricas de fibras de curauá modificada com polianilina. *Polímeros* 20:377–382. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000058>
52. Lopes MC, Souza Jr. FG, Oliveira GE (2010) Espumados magnetizáveis úteis em processos de recuperação ambiental. *Polímeros* 20:359–365. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000054>
53. Souza Jr. FG, Oliveira GE, Lopes MC (2012) Environmental Recovery by Magnetic Nanocomposites Based on Castor Oil – Chapter 22. In: *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs - CRC Press Book*, 1st ed. Apple Academic Press, Inc., 1613 Beaver Dam Road, Suite 104 Point Pleasant, NJ 08742 USA, p 370
54. Icart L, Fernandes E, Agüero L, et al. (2017) End Functionalization by Ring Opening Polymerization: Influence of Reaction Conditions on the Synthesis of End Functionalized Poly(lactic Acid). *J Braz Chem Soc.* <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170118>
55. Picciani PHS, Soares BG, Medeiros ES, et al. (2009) Electrospinning of Polyaniline/Poly(Lactic Acid) Ultrathin Fibers: Process and Statistical Modeling using a Non Gaussian Approach. *Macromol Theory Simul* 18:528–536. <https://doi.org/10.1002/mats.200900053>
56. Souza Jr FG, Orlando MTD, Michel RC, et al. (2011) Effect of pressure on the structure and electrical conductivity of cardanol–furfural–polyaniline blends. *J Appl Polym Sci* 119:2666–2673. <https://doi.org/10.1002/app.32848>
57. Ferreira SR, da Silva AM, Souza Jr FG, et al. (2014) Effect of Polyaniline and H₂O₂ Surface Modification on the Tensile Behavior and Chemical Properties of Coir Fibers. *J Biobased Mater Bioenergy* 8:578–586. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2014.1478>
58. Spindola KC, Simas NK, Santos CE dos, et al. (2016) *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. *Rev Bras Farmacogn* 26:342–346
59. Baldanza VAR, Souza FG, Filho ST, et al. (2018) Controlled-release fertilizer based on poly(butylene succinate)/urea/clay and its effect on lettuce growth: Controlled-release fertilizer based on poly(butylene succinate)/urea/clay and its effect on lettuce growth. *J Appl Polym Sci* e46858. <https://doi.org/10.1002/app.46858>
60. Souza Jr. F.G., Andréa Maria da Silva, de Oliveira GE, et al. (2015) Conducting and magnetic mango fibers. *Ind Crops Prod* 68:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.032>
61. Gomes FW, Lima RC, Piombini CR, et al. (2018) Comparative Analyses of Poly(ethylene 2,5-furandicarboxylate) – PEF – and Poly(ethylene terephthalate) – PET – Resins and Production Processes. *Macromol Symp* 381:1800129. <https://doi.org/10.1002/masy.201800129>
62. Péres EUX, Souza Jr. FG, Silva FM, et al. (2014) Biopolyester from ricinoleic acid: Synthesis, characterization and its use as biopolymeric matrix for magnetic nanocomposites. *Ind Crops Prod* 59:260–267. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.031>
63. Souza Jr. FG, Oliveira GE, Anzai T, et al. (2009) A Sensor for Acid Concentration Based on Cellulose Paper Sheets Modified with Polyaniline Nanoparticles. *Macromol Mater Eng* 294:739–748. <https://doi.org/10.1002/mame.200900111>
64. Souza Jr. FG, Marins JA, Rodrigues CHM, Pinto JC (2010) A Magnetic Composite for Cleaning of Oil Spills on Water. *Macromol Mater Eng* 295:942–948. <https://doi.org/10.1002/mame.201000090>
65. Grance EO, dos Santos E, Andrade C, et al. (2016) Smart composite useful to acid release. *J Appl Polym Sci* 133:

66. da Costa RC, Pereira ED, de Jesus EO, et al. (2018) Drug Micro-Carriers Based on Polymers and Their Sterilization. *Chem Chem Technol* 12:473–487. <https://doi.org/10.23939/chcht12.04.473>

67. Souza Jr. FG, Ferreira AC, Varela A, et al. (2013) Methodology for determination of magnetic force of polymeric nanocomposites. *Polym Test* 32:1466–1471. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2013.09.018>



Проф. М. И. Штильман

*Российский химико-технологический университет
имени Д. И. Менделеева, Россия*

E-mail: shtilmanm@yandex.ru

Основные научные интересы профессора М. И. Штильмана – полимерные био- и гемосовместимые, наноразмерные, биodeградируемые материалы для медицины, биотехнологии, генной инженерии. Эти полимеры показали себя как эффективные материалы для замещения костных фрагментов и мягких тканей, покрытий ран и ожогов, подложек и носителей для тканевой и генной инженерии.

Михаилом Исааковичем впервые предложена новая группа наноразмерных носителей – агрегаты амфифильных производных водорастворимых синтетических полимеров, которые могут использоваться самостоятельно и в композициях с биodeградируемыми полиэфирами и гидрогелями. Это позволило сформировать и развить принципиально новое направление в создании иммобилизованных наноразмерных форм биологически активных и лекарственных веществ.

Сегодня под руководством проф. М. И. Штильмана разработано большое количество иммобилизованных в полимерных системах биологически активных лекарственных веществ: антибиотиков, противовоспалительных, антираковых веществ, белков, нуклеиновых кислот. Иммобилизация в наноагрегатах амфифильных полимеров позволила придать иммобилизуемым веществам совместимость с водой, пролонгированное действие, пониженную токсичность, возможность целевой доставки к пораженному органу.

БИОМАТЕРИАЛЫ – ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

М. И. Штильман

*Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева,
125047, Россия, Москва, Миусская пл., д. 9; e-mail: shtilmanm@yandex.ru*

Область создания, исследования и применения биоматериалов, т. е. материалов, изделия и препараты, на основе которых функционируют в условиях взаимодействия с биологическими объектами, в последние десятилетия сформировалась в важное направление, играющее во многих случаях ключевую роль в решении задач наук и технологий, оптимизирующих жизнедеятельность человека, объединяемых понятием *life science*

and technology – медицины, биотехнологии, косметической и пищевой промышленности, сельского хозяйства и др. [1].

Важнейшее место среди биоматериалов занимают полимеры, которые наряду с неорганическими углеродными материалами и металлами, широко используются для создания различных объектов медико-биологического назначения – имплантатов, биологически активных систем, искусственных биокатализаторов, биоаналитических систем, биodeградируемых материалов общего назначения и т. п. [2]. При этом особенно интенсивно развиваются направления, связанные с использованием биоматериалов в таких областях как создание материалов с заданными сроками разрушения в биологических системах (в первую очередь на основе сложных полиэфиров синтетического и биосинтетического происхождения), компонентов лекарственных систем, обладающих векторными свойствами, материалов для биоинженерных процессов, в частности, тканевой инженерии для регенеративной медицины, а также, генной инженерии при использовании перемещения генетического материала методом трансфекции.

Можно ожидать дальнейшей интенсификации работ в этом направлении, разработки новых объектов, отличающихся важными полезными характеристиками, и увеличения информационного потока в этой области.

Список литературы

1. Shtilman M. I. Bioactive Systems. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. – Taylor & Francis. – 2016. – pp. 469–474.
2. Shtilman M. I. Biodegradation. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. – Taylor & Francis. – 2016. – pp. 804–816.



Dr. Takeharu Tsuge

*Dept. of Materials Science and Engineering,
Tokyo Institute of Technology, Japan*

E-mail: tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

The use of petroleum plastics is one of the causes of increasing CO₂ in the atmosphere. In order to prevent further global warming caused by petroleum-originating CO₂, it is necessary to use renewable plastics instead of petroleum plastics. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bio-polyesters with thermoplasticity and biodegradability, which can be synthesized by bacterial fermentation from renewable biomass. Our research group focuses on the creation of new PHAs with high material performance as environment-friendly plastics. So far, we have developed some new PHAs such as branched-side-chain PHA, aromatic PHA, transparent/elastic PHA, and ultrahigh molecular weight PHA.

**MICROBIAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES
BY RECOMBINANT BACTERIA**

Dr. Takeharu Tsuge

The use of petroleum plastics is one of the causes of increasing CO₂ in the atmosphere. In order to prevent further global warming caused by petroleum-originating CO₂, it is necessary to use renewable plastics instead of petroleum plastics. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bio-polyesters with thermoplasticity and biodegradability, which can be synthesized by bacterial fermentation from renewable biomass. Our research group focuses on the creation of new PHAs with high material performance as environment-friendly plastics.

An obligate anaerobic bacterium *Peptoclostridium difficile* (formerly known as *Clostridium difficile*) has a unique metabolic pathway to convert leucine to 4-methylvalerate, in which 4-methyl-2-pentenoyl-CoA (4M2PE-CoA) is an intermediate of this pathway. 4M2PE-CoA is also able to be converted to 3-hydroxy-4-methylvalerate (3H4MV), a branched side chain monomer unit, for synthesis of PHA copolymer. To synthesize 3H4MV-containing PHA copolymer from leucine, the leucine metabolism-related enzymes (LdhA and HadAIBC) derived from *P. difficile* and PHA biosynthesis enzymes (PhaPCJ_{Ac} and PhaAB_{Re}) derived from *Aeromonas caviae* and *Ralstonia eutropha* were co-

expressed in the codon usage-improved *Escherichia coli* [1]. Under microaerobic culture conditions, this *E. coli* was able to synthesize P(3HB-co-12.2 mol%-3H4MV) from glucose with the supplementation of 1 g/L leucine. Thus, we demonstrated the potential of the new metabolic pathway for 3H4MV synthesis using leucine metabolism-related enzymes from *P. difficile*.

The discovery of the lactate-polymerizing enzyme (LPE) enabled the biosynthesis of a PHA containing 2-hydroxyalkanoate (2HA). Amino acids are potential precursors of 2HA with various side chain structures if appropriate enzymes are used to convert amino acids to 2HA-coenzyme A (CoA) as the substrate for LPE. We focused on the utility of (*R*)-2-hydroxy-4-methylvalerate (2H4MV) dehydrogenase (LdhA) and 2H4MV-CoA transferase (HadA) from *P. difficile* as 2HA-CoA supplying enzymes. By expressing LPE, LdhA, and HadA in *Escherichia coli* DH5a, we successfully produced poly(3-hydroxybutyrate-co-2HA) [P(3HB-co-2HA)] from a related or unrelated carbon source. The 2HA units incorporated into PHA from unrelated carbon sources were primarily 2H4MV and 2-hydroxy-3-phenylpropionate (2H3PhP), which were assumed to be derived from endogenous leucine and phenylalanine, respectively. Furthermore, P(3HB-co-22mol%-2HA) synthesis was demonstrated by means of saccharified sugars, which are an abundant and renewable feedstock for polymer production from hemicellulose biomass (Japanese cedar) as the carbon source. Our study shows that several types of 2HA units such as 2H4MV and 2H3PhP are endogenous monomers for PHA biosynthesis in *E. coli* expressing LdhA and HadA.

Next, without addition of leucine, PHA with a relatively high 2HA fraction of 17 mol% was synthesized. Additionally, a systematically boost in the 2H4MV fraction was achieved by adding leucine, and a 2HA fraction ranging from 17 to 53 mol% was achieved. P(2H4MV) homopolymer was also synthesized by only expressing 2HA-supplying enzymes in the designed biosynthetic pathway. P(3HB-co-2HA) exhibited a significant change in physical property at around 20 mol% of 2HA fraction, namely the crystalline characteristics with low 2HA fraction and the amorphous features with higher 2HA fraction.

Other than blanched side-chain polymers, we have developed some new PHAs such as high molecular weight PHA [2], aromatic PHA [3], transparent/elastic PHA [4], and heat resistant PHA [5].

References

1. Mizuno, S., Enda, Y., Saika, A., Hiroe, A., Tsuge, T. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxy-4-methylvalerate and 2-hydroxy-3-phenylpropionate units from a related or unrelated carbon source. *J Biosci Bioeng*, 125, 295 (2018).
2. Hiroe, A., Hyakutake, M., Thomson, N. M., Sivaniah, E., Tsuge, T. Endogenous ethanol affects biopolyester molecular weight in recombinant *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol*, 8, 2568 (2013).
3. Mizuno, S., Katsumata, S., Hiroe, A., Tsuge, T. Biosynthesis and thermal characterization of polyhydroxyalkanoates bearing phenyl and phenylalkyl side groups. *Polym Degrad Stabil*, 109, 379 (2014).

4. Hiroe, A., Ishii, N., Ishii, D., Kabe, T., Abe, H., Iwata, T., Tsuge, T. Uniformity of monomer composition and material properties of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesized from pure and crude fatty acids. *ACS Sustainable Chem Eng*, 4, 6905 (2016).

5. Watanabe, Y., Ishizuka, K., Furutate, S., Abe, H., Tsuge, T. Biosynthesis and characterization of novel poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-2-methylbutyrate): thermal behavior associated with α -carbon methylation. *RSC Adv*, 5, 58679 (2015).



Dr.-Ing. Sebastian L. Riedel

*Technische Universität Berlin, Institute
of Biotechnology, Chair of Bioprocess
Engineering, Berlin, Germany*

E-mail: riedel@tu-berlin.de

Sebastian L. Riedel studied biotechnology at the BHT Berlin and received his doctorate (summa cum laude) at the TU Berlin in 2016. Dr.-Ing. Sebastian L. Riedel has been working for over 11 years on the bioprocess development of PHA bioplastics from renewable raw and residual materials in various scientific institutions: MIT (2009-2012, Prof. Anthony Sinskey), VLB Berlin (2012-2013), Fraunhofer IPK (2013-2016) and TU Berlin (since 2017). At the Chair of Bioprocess Engineering of the TU Berlin by Prof. Peter Neubauer, he is group leader of the groups Smart Bioproduction Grids and Process Analytical Technology.

**PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGIES FOR ENHANCED
POLYHYDROXYALKANOATE BIOPLASTIC PRODUCTION
FROM LIPID BASED BIOGENIC WASTE STREAMS**

**Björn Gutschmann, Lara Santolin, Peter Neubauer,
Stefan Junne, Sebastian L. Riedel**

The worldwide plastic pollution and the continuing climate change are among the biggest challenges of today's society. Substitution of conventional plastics with polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics addresses both issues, since PHAs are fully biodegradable in nature and PHAs can be produced with a lower CO_2 -footprint than fossil-based plastics. However, the worldwide PHA production is still negligible, due to high production costs, partly caused by the substrate supply. To address this issue, biogenic feedstocks, which show little competition to other industries, are utilized in this study to enable a low-cost PHA production. Additionally, the process is tended to work substrate flexible to avoid dependencies on a single feedstock [1–3].

Process development from mL- to 100 L-scale with various biogenic waste streams for the production of polyhydroxybutyrate and the copolymer poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) with *Ralstonia eutropha* is shown. Difficulties through inhomogeneous distribution of the chosen feedstock (e.g. waste animal fat) in the aqueous media, especially caused through high

melting temperatures (up to 60 °C), had to be overcome to reach reproducible Results:

A cultivation method for 24-microwell plates was developed to perform parallel cultivations at small scale. A feeding strategy, which leads to a productivity of $>1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and 71 g L^{-1} PHA in bioreactors and a novel method for *in-line* PHA monitoring by Photon Density Wave spectroscopy [4] was developed. To decrease set-up times, a repeated fed-batch strategy was performed, where the batch phase could be shortened to 1/3, with no sterilization between these cultivations. The presented Results will allow to lower the PHA production costs further in the future.

References

1. Brigham CJ and Riedel SL: The Potential of Polyhydroxyalkanoate Production from Food Wastes, 2018, Appl. Food Biotechnol. 6:7–18.
2. Riedel SL and Brigham C: Polymers and Adsorbents from Agricultural Waste, 2019, In: Byprod. from Agric. Fish. 22:523–544.
3. Riedel SL et al.: Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats, 2015, J. Biotechnol. 214:119–127.
4. Gutschmann B et al.: In-Line Monitoring of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production during High-Cell-Density Plant Oil Cultivations Using Photon Density Wave Spectroscopy, 2019, Bioengineering 6:85.

СВОЙСТВА РАЗРУШАЕМЫХ ПГА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ ШТАММОМ *CUPRIAVIDUS NECATOR* IBP-21 НА РАЗЛИЧНЫХ С-СУБСТРАТАХ

Н. О. Жила^{1,2}, А. Д. Васильев^{1,3}, Е. Г. Киселев^{1,2}

¹Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50

²Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

³Институт физики им. Л. В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН,
Россия, Красноярск, Академгородок, 50/38

Свойства полигидроксиалканоатов (ПГА) определяются их структурой и прежде всего зависят от строения боковых групп в полимерной С-цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле [1–3]. Способность к синтезу полимеров различного состава определяется физиолого-биохимическими характеристиками штаммов – продуцентов, организацией внутриклеточной ферментной системы синтеза ПГА и субстратной специфичности ПГА-синтазы, – фермента, катализирующего реакции полимеризации мономеров. Среди факторов среды, влияющих на химический состав синтезируемых ПГА, – это источник углеродного питания, то есть С-субстрат.

Цель работы – исследование состава мономеров и физико-химических свойств ПГА, синтезированных штаммом *Cupriavidus necator* IBP-21 при выращивании на различных С-субстратах.

Материалы и методы

Внутриклеточное содержание ПГА и состав определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре ГХ-МС (7890/5975С, Agilent Technologies, США). Физическими методами исследования определяли молекулярно-массовые характеристики полимеров (средневесовую (M_v), среднечисловую (M_n) молекулярную массу, полидисперсность (D)). Термический анализ ПГА выполнен с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария), находили температуры плавления ($T_{пл}$) и термической дегградации ($T_{дегр}$). Рентгеновские исследования сняты на порошковом дифрактометре D8ADVANCE (Bruker AXS, Германия) с линейным детектором VANTEC, степень кристалличности (C_x) определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтенным фоном к площади без вычитания аморфного фона.

Результаты

При культивировании *C. necator* IBP-21 на различных С-субстратах различались продукционные показатели культуры и эффективность использования субстратов, а также состав и свойства синтезированных полимеров. Подтверждено влияние типа углеродного субстрата на состав

ПГА. При росте на олеиновой кислоте и всех растительных маслах синтезированы сополимеры: на олеиновой кислоте двухкомпонентные сополимеры, П(ЗГБ-*co*-ЗГВ), содержащие в С-цепи доминирующих мономеров 3-гидроксибутирата (ЗГБ) включения мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ). На трех растительных маслах синтезированы трехкомпонентные сополимеры П(ЗГБ-*co*-ЗГВ-*co*-ЗГГ), образованные мономерами ЗГБ (свыше 99 мол.%) и содержащие минорные включения мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ) и 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) (см. табл. 1).

Таблица 1
 Состав и свойства ПГА, синтезированных *S. necator* IВР-21
 на различных С-субстратах

N	С-субстрат:	Состав мономеров в ПГА, мол.%			M_n , кДа	M_w , кДа	\bar{D}	C_x , %	$T_{пл.}$, °С	$T_{дегр.}$, °С
		ЗГБ	ЗГВ	ЗГГ						
1	CO_2	100,0	–	–	290 ± 15	850 ± 25	2,9 ± 0,2	67	171,2	280,1
2	Фруктоза	100,0	–	–	136 ± 9,0	499 ± 20	3,7 ± 0,4	65	172,4	284,7
3	Глюкоза	100,0	–	–	137 ± 0,2	557 ± 24	4,1 ± 0,2	64	171,6	279,9
4	Глицерин	100,0	–	–	108 ± 4,0	409 ± 11	3,9 ± 0,3	69	172,8	274,9
5	Лауриновая кислота	100,0	–	–	162 ± 11	510 ± 1	3,2 ± 0,2	63	161,0 170,6	279,0
6	Миристи- новая кислота	100,0	–	–	144 ± 10	648 ± 12	4,5 ± 0,3	65	162,1 170,8	275,8
7	Пальми- тиновая кислота	100,0	–	–	174 ± 8	673 ± 4	3,9 ± 0,2	72	162,9 171,2	283,4
8	Олеиновая кислота	99,70	0,3	–	118 ± 4	526 ± 2	4,5 ± 0,2	66	162,7 170,3	285,9
9	Пальмовое масло	99,80	0,07	0,13	165 ± 6	682 ± 9	4,1 ± 0,2	66	162,5 171,1	277,6
10	Подсолнечное масло	99,77	0,21	0,02	124 ± 2	479 ± 4	3,9 ± 0,1	70	160,7 169,6	267,6
11	Рыжиковое масло	99,71	0,25	0,04	149 ± 9	511 ± 21	3,4 ± 0,2	65	160,5 169,8	285,3

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о различиях физико-химических свойств полимеров, и прежде всего, молекулярно-массовых характеристик, которые являются одной из основных характеристик высокомолекулярных соединений и влияют на процессы переработки полимеров в изделия и их механические характеристики. Так, наиболее высокие значения молекулярной массы (M_n и M_w) и сниженная полидисперсность (\bar{D}) зарегистрированы у П(ЗГБ), синтезированного в автотрофных условиях на CO_2 . В то время как все остальные образцы П(ЗГБ), синтези-

рованные на органических субстратах, имели пониженные значения молекулярной массы и повышенную полидисперсность.

Зарегистрированное снижение M_w у П(ЗГБ), синтезированного *S. necator* IBP-21 на ЖК и растительных маслах, на 200 и даже 350 кДа у отдельных образцов по сравнению с результатом на CO_2 и повышению величины D до 3,2-4,5 согласуется с известными данными [4] о том, что рост бактерий на пальмовом масле способствует включению в состав ПГА мономеров, отличных от 3-гидроксibuтирата, но при этом может сопровождаться значительным снижением молекулярной массы ПГА и возрастанием полидисперсности. По мнению автора работы [5], снижение молекулярной массы ПГА при росте на маслах является результатом метаболизма триацилглицеринов в культуре, содержащей масло, и высвобождением глицерина, который действует в качестве агента, блокирующего реакции полимеризации мономеров, что приводит к укорочению полимерных С-цепей и получению полимера с более низкой молекулярной массой. Подтверждением этому является результат наиболее выраженного снижения молекулярной массы образцов П(ЗГБ), синтезированных исследуемым *S. necator* IBP-21 на глицерине.

Степень кристалличности образцов ПГА, синтезированных на исследуемых С-субстратах, не выявила значительных отличий величины C_x , значения которой лежали в достаточно узком диапазоне (65–72 %), независимо от типа С-субстрата и строения синтезированных полимеров (см. таблицу); статистически значимых отличий значения C_x не выявлено. Температурные характеристики ПГА, и способность кристаллизоваться в нативном состоянии являются важными параметрами, так как определяют термомеханические свойства и, следовательно, возможности переработки в изделия из расплавов. Наличие выраженного диапазона между температурой начала плавления и температурой начала термического разложения является важным технологическим свойством полимера, так как делает возможным получение на его основе изделий общепринятыми методами переработки полимерных расплавов (формованием из раствора, экструзией, литьем под давлением). Показатели температуры плавления ($T_{пл}$) и термической дегградации ($T_{дегр}$) у всех исследованных образцов ПГА имели близкие значения, не выходящие за рамки достоверных отличий. Так, значения $T_{пл}$ лежали в диапазоне 160–172 °С; $T_{дегр}$ – 267–285 °С.

Заключение

Синтезировано семейство ПГА новым штаммом *Cupriavidus necator* IBP-21 и исследованы химический состав и свойства. Показано, что состав мономеров в полимерах и свойства ПГА зависят от штаммовых особенностей микроорганизмов продуцентов и типа ростового С-субстрата.

Список литературы

1. Sudesh, K. Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates. “Smitthes”, London, UK 2010.

2. Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoate. *Prog Polym Sci.* – 2013. – 38. – P. 536–583.
3. Volova, T.G., Shishatskaya, E.I., Sinsky, A.J. *Degradable polymers: Production, properties, applications.* Nova Science Pub Inc., NY, USA, 2013, 380 p.
4. Sato, S., Maruyama H., Fujiki, T., Matsumoto K. Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as co-substrate. *J. Biosci. Bioeng.* 2015. – 120. – 246-251.
5. Tomozawa, S., Saito, Y., Nakamura, Y., Abe, H., Tsuge, T. Chain transfer reaction catalyzed by various PHA synthases with poly(ethyleneglycol) as an exogenous chain transfer agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. – 87. – 1427–1435.

СИНТЕЗ РАЗРУШАЕМЫХ ПГА НОВЫМ ШТАММОМ *CUPRIAVIDUS* *NECATOR* IBP-21 НА РАЗЛИЧНЫХ С-СУБСТРАТАХ

Н. Жила, К. Сапожникова

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79
Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50

Разрушаемые полигидроксиалканоаты (ПГА) в настоящее время оцениваются в качестве реального кандидата для постепенной замены не разрушаемых синтетических полимеров, повсеместное применение которых создает глобальную экологическую проблему. ПГА – это семейство полимеров различного химического состава, которые обладают полезными свойствами, включая биосовместимость и биоразлагаемость. Это выдвигает эти биополимеры в разряд перспективных материалов XXI в. для применения в различных сферах, – от коммунального и сельского хозяйства до фармакологии и биомедицины.

Несмотря на острую потребность практики в разрушаемых полимерных материалах и высокую привлекательность ПГА, увеличение объемов их производства и расширение областей применения сдерживаются высокой стоимостью и сложностями технико-технологического характера [1]. Ключевая проблема биотехнологии ПГА – это оптимизация биотехнологических процессов синтеза в целом, прежде всего, за счет применения новых продуктивных штаммов, способных к росту на различных доступных субстратах и синтезу ПГА различного химического состава с более высокими эксплуатационными свойствами.

Цель работы – исследование синтеза ПГА в культуре штамма *Cupriavidus necator* IBP-21 на различных С-субстратах.

Материалы и методы

Стерильное культивирование бактерий в автотрофных условиях проводили по методу и на солевой среде Шлегеля [2] на смеси газов $CO_2:O_2:H_2$ в соотношении как 1:2:7 % об. В гетеротрофных условиях в качестве источника углерода и энергии использовали различные С-субстраты в концентрации в среде 5–10 г: набор фруктозу и глюкозу; очищенный глицерин; жирные кислоты (пальмитиновая, миристиновая, стеариновая, олеиновая) и растительные масла – подсолнечное рафинированное и рыжиковое («Золотая семечка», Россия), пальмовое отбеленное рафинированное дезодорированное («Oil de Luxe», Индонезия). Оценка продукционных показателей культуры включала: урожай биомассы бактерий (X , г/л); концентрация полимера в клетках (% к АСБ); экономический коэффициент по С-субстрату (Y , г/г).

Результаты

Показана способность данного штамма к синтезу резервных ПГА в автотрофной суспензионной культуре с использованием CO_2 в качестве единственного источника углерода и реакции окисления H_2 в качестве энергетического субстрата. Урожай биомассы бактерий и концентрация полимера составили в 3-х суточной культуре 2,6 г/л и 35,1 % соответственно. Это сопоставимо с показателями у штамма *Alcaligenes eutrophus* Z-1 [3] и уступает характеристикам штаммов из коллекции Института биофизики СО РАН *Ralstonia eutropha* B5786 и *Cupriavidus eutrophus* B10646, которые в аналогичных условиях обеспечивают получения биомассы до 3,5–4,0 г/л при выходах по полимеру до 60–70 % и выше [4]. Однако следует отметить, что исследуемый штамм выделен недавно, в основном поддерживается в музейной культуре на агаризованной среде, к настоящему времени не эксплуатировался длительно в суспензионной культуре, не селективен по скорости. Поэтому в ходе дальнейших исследований можно ожидать повышение продукционных показателей.

Штамм *S. necator* ИВР-21 оказался способен к росту и синтезу ПГА на различных С-субстратах, – CO_2 , сахарах, глицерине, жирных кислотах и растительных маслах (см. рис. 1). Это свидетельствует о функционировании в этом микроорганизме различных путей синтеза ПГА.

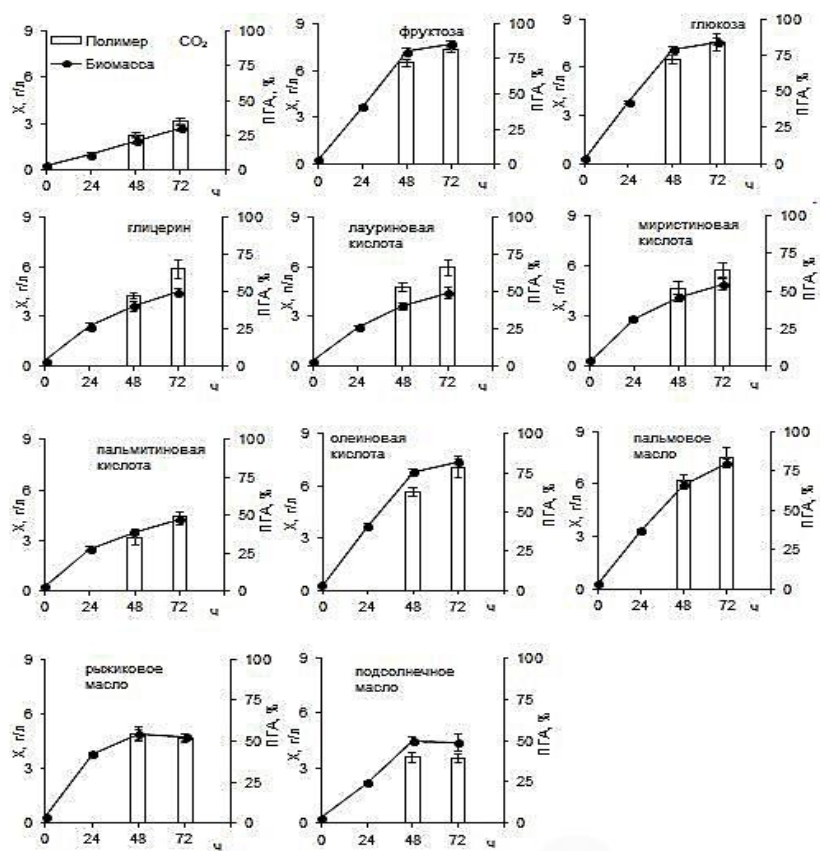


Рис. 1. Продукционные характеристики штамма *S. necator* ИВР-21 при росте на различных С-субстратах: урожай биомассы клеток (X, г/л) и внутриклеточная концентрация ПГА (% от АСБ)

Сахара являются наиболее распространенным субстратом для многих микроорганизмов, включая продуцентов ПГА, которые способны метаболизировать гексозы ($C_6H_{12}O_6$) для роста. Относительно таксона водородокисляющих бактерий, известно, что из спектра сахаров они утилизируют только фруктозу, при этом легко подвергаются мутациям с приобретением способности к метаболизму глюкозы. Общеизвестным углеводом, позволяющим достигать высоких выходов ПГА, является кетогексоза (фруктоза). При замене фруктозы и росте бактерий на глюкозе она метаболизируется также по пути Энтнера-Дудорова [5]. Штамм *C. necator* IBP-21 оказался способным к метаболизму глюкозы и для его выращивания на этом субстрате не потребовалось длительного отбора на селективной среде с глюкозой в качестве единственного С-источника, как это имело место при получении глюкозоусваивающего мутанта *R. eutropha* В 8562 из исходного штамма *R. eutropha* В 5786. В культуре *C. necator* IBP21 показатели роста и синтеза ПГА на фруктозе и глюкозе были близкими; урожай биомассы составил порядка 7,0 и 7,7 г/л, содержание полимера 81,1 и 84,3 %.

Среди субстратов для производства ПГА в настоящее время рассматривают глицерин – отход крупнотоннажного производства биодизеля, масштабы производства которого возрастают. Способность штамма *C. necator* IBP-21 синтезировать ПГА на глицерине, исследована с применением очищенного глицерина (содержание примесей 0,3 %). Связано это с тем, что выходы ПГА на глицерине в значительной мере зависят от степени его очистки и количества примесей, среди которых присутствуют метанол, соли, эфиры жирных кислот и др. и которые могут значительно ингибировать рост микроорганизмов. Из данных рисунка следует, что на очищенном глицерине урожай биомассы бактерий *C. necator* IBP-21 составил 5,0 г/л при содержании полимера 65,1 %. Экономический коэффициент при росте штамма на глицерине по урожаю биомассы и полимера составил, соответственно, $Y_X = 0,38 \pm 0,02$ г/г и $Y_{ПГА} = 0,290 \pm 0,015$ г/г.

Следующими исследуемыми субстратами для оценки синтеза ПГА штаммом *C. necator* IBP21 были жирные кислоты (ЖК). Жиродержащие субстраты в настоящее время активно исследуются в качестве потенциального и перспективного источника С-сырья для синтеза ПГА; среди них – не только отдельные жирные кислоты, но также отработанные кулинарные жиры и продукты их переработки, растительных масла различного состава и происхождения. Перспективность этих субстратов обусловлена высоким содержанием в них углерода и высокой степенью превращения в ПГА. Рост и синтез ПГА исследован в культуре *C. necator* IBP-21 на насыщенных (лауриновой, миристиновой, пальмитиновой) и ненасыщенной олеиновой кислотах. Наиболее высокие показатели по урожаю биомассы и внутриклеточной концентрации ПГА получены при культивировании штамма на олеиновой кислоте, которые составили 8,0 г/л и 78,4 %. При росте *C. necator* IBP-21 на всех насыщенных ЖК показатели

по урожаю биомассы были близки результату на олеиновой кислоте, но по синтезу полимера уступали, составив на лауриновой и миристиновой кислотах, соответственно, 65,9 и 64,2 %; и еще ниже (49 %) – на пальмитиновой кислоте.

В качестве ростового С-субстрата исследованы три образца растительных масел: пальмовое, рыжиковое и подсолнечное. Подсолнечное масло относится к группе жидких масел, в котором идентифицированы в качестве доминирующих линолевая (18:2 ω 6) и олеиновая кислоты (18:1 ω 9); остальные кислоты (20:0, 22:0 и 24:0) присутствовали в небольших количествах, на уровне 0,4–1,1 %; коэффициент насыщенности масла составил 0,14. В составе ЖК рыжикового масла идентифицировано 15 ЖК с преобладанием аналогично подсолнечному, ненасыщенные ЖК (порядка 90%); его коэффициент насыщенности близок рафинированному подсолнечному (0,11). Пальмовое масло относится к полутвёрдым и твердым растительным маслам; коэффициент насыщенности исследованного образца пальмового масла составил 0,97. Это свидетельствует о доминировании в составе насыщенных ЖК. Таким образом, исследуемые масла имели значительные отличия по набору и соотношению ЖК.

На рис. 1 показано, что среди исследуемых растительных масел наиболее высокие продукционные характеристики культуры *Cupriavidus necator* IBP-21 получены на пальмовом масле. Урожай биомассы бактерий и внутриклеточное содержание полимера составили, соответственно, до 8,2 г/л и 80 %. При росте на подсолнечном масле продукционные показатели у исследуемого штамма уступали результатам на пальмовом; урожаем биомассы составил 4,3 г/л, содержание полимера 38,7 %. При росте на рыжиковом масле в качестве субстрата урожай биомассы бактерий составила 5,8 г/л, содержание полимера – 59 %. Экономический коэффициент по урожаю биомассы бактерий и полимеру определен для пальмового, рыжикового масел и жирных кислот на уровне 0,76 г биомассы/г субстрата и 0,48 г полимера/г субстрата, что в 1,5–2,0 раза выше, чем на подсолнечном масле, а также сахарах и глицерине.

Заключение

Штамм бактерий, выделенный из почвы, идентифицирован как *Cupriavidus necator* IBP-21 и исследован в качестве продуцента ПГА. Установлены способность штамма к росту и синтезу ПГА в автотрофных условиях на CO_2 в смеси с H_2 с O_2 и широкий органотрофный потенциал по отношению к различным С-субстратам: сахарам, глицерину, жирным кислотам и растительным маслам (рыжиковому, подсолнечному, пальмовому). Наиболее высокие урожай биомассы бактерий (7–8 г/л) и ПГА получены на олеиновой кислоте (78 %); фруктозе, глюкозе и пальмовом масле (свыше 80 %). Новый штамм *Cupriavidus necator* IBP-21 оценен как перспективный продуцент ПГА.

Список литературы

1. G.-Q. Chen, X.Yu Chen, F.-Q. Wu, J.-C. Chen. Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 2020, 3, 1-7.
2. Schlegel H. G., Kaltwasser H., Gottschalk G. Ein Submers Verfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstum physiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* – 1961. – Bd.38. – P. 209–222.
3. Zavarzin, G. A., 1978. *Vodorodnyye bakterii i karboksidobakterii (Hydrogen bacteria and carboxydobacteria)*. Nauka, Moscow. (in Russian).
4. Volova T. G. (2009) *Hydrogen-based Biosynthesis*. Nova Science Pub Inc. 287 p.
5. L. Madison and G. W. Huisman. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – V. 63 (1). – P. 2–53.

CUPRIAVIDUS NECATOR B-10646 GROWTH AND POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION ON DIFFERENT PLANT OILS

Natalia Zhila, Kristina Sapozhnikova

*Siberian Federal University, 79 Svobodnyi av., Krasnoyarsk, 660041, Russia
Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center
SB RAS” 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

PHA cost, however, still limits the increase in PHA production and restricts the scope of PHA application. As raw carbon sources are responsible for about 40–50 % of the PHA production cost, one of the conditions for successful commercialization of these polymers is expanding the range of feedstocks. Potential raw materials for PHA synthesis are various substrates with different degrees of reduction, energy content, and cost, including individual carbon compounds and various industrial wastes.

One of the ways to reduce PHA cost is to use inexpensive carbon sources such as plant oils. Other advantages of plant oils are their high carbon content and high efficiency of conversion into PHAs [1–3].

The purpose of the present study: a comparative investigation of the growth of the wild-type strain *Cupriavidus necator* B-10646 and PHA synthesis by the cells of this strain on plant oils differing in the FA composition.

Materials and methods

Plant oils were sunflower seed oil (Russia), Siberian oilseed oil (Russia), and palm oil (Malaysia) (purchased from a local supermarket). Tween 80, coco glucoside, and sodium cocoyl glutamate were used as emulsifiers. To check the presence/absence of the inhibitory effect of emulsifiers, the autoclaved emulsifiers were added to the mineral media to the desired concentrations. In addition to an emulsifier, fructose was added to the mineral medium as carbon source at a concentration of 15 g/L. The medium was replenished with a corresponding concentration of fructose when it was consumed.

Results

In the present study, PHA synthesis by the *Cupriavidus necator* B-10646 bacterium was investigated in experiments with bacterial cells cultivated on palm oil, Siberian oilseed oil, and two types of sunflower seed oil (refined and unrefined oils) as the main carbon substrate. The fatty acid compositions of the oils are listed in Table 1, which shows that the oils differ in both the combinations and percentages of FAs. Sunflower seed oil is liquid oil with the highest contents of linoleic acid – an ω -6 fatty acid. The sample of refined sunflower seed oil contained 7 fatty acids, and linoleic acid (18:2 ω 6) constituted 63,1 % of total FA, while in the unrefined sunflower seed oil, its content reached 60,8 %. The saturation indices of the refined and unrefined oils were

0,14 and 0,20, respectively. The FA composition of Siberian oilseed oil was the most representative, with the number of fatty acids reaching 15 (C16-C24). Like in sunflower seed oil, unsaturated fatty acids dominated the FA composition, constituting about 90 %. Only this oil contained α -linolenic acid (18:3 ω 3), and its percentage was the highest (29,1). The saturation index of Siberian oilseed oil was comparable to that of sunflower seed oil (0,11). Palm oil is semisolid or solid plant oil. The composition of this oil varies considerably depending on the production and purification processes employed. Saturation index of the palm oil sample was 0,97. The content of palmitic acid was the highest (44,2%), followed by monoenoic oleic acid (39,6%) and by the dienoic linoleic acid (11,1%). Thus, the oils used in this study differed significantly in their FA compositions and FA percentages.

Table 1

Fatty acid composition of plant oils (% of total fatty acids)

Fatty acid	Common name of fatty acid	Palm oil	Siberian oilseed oil	Refined sunflower seed oil	Unrefined sunflower seed oil
14:0	Myristic	0,9	–	–	–
16:0	Palmitic	44,2	4,3	7,4	8,4
18:0	Stearic	4,2	1,4	3,1	2,9
18:1 ω 9	Oleic	39,6	18,2	24,5	22,8
18:2 ω 6	Linoleic	11,1	22,4	63,1	60,8
18:3 ω 3	α -Linolenic	–	29,1	–	–
20:0	Arachidic	–	3,6	0,4	0,4
20:1 ω 9	Eicosenoic	–	11,3	–	–
20:2 ω 6	Eicosodienoic	–	1,1	–	–
20:3 ω 3	Eicosotrienoic	–	1,4	–	–
22:0	Docosanoic	–	0,6	1,1	1,0
22:1 ω 9	Docosenoic	–	4,7	–	–
22:2 ω 6	Docosadienoic	–	0,2	–	–
22:3 ω 3	Docosatrienoic	–	0,4	–	–
24:0	Tetracosanoic	–	0,3	0,4	0,8
24:1 ω 9	Tetracosenoic	–	1,0	–	–
26:0	Hexacosanoic	–	–	–	0,7
28:0	Octacosanoic	–	–	–	1,1
30:0	Triacotanoic	–	–	–	1,1
Σ SFA		49,3	10,2	12,4	16,4
Σ SFA/ Σ USFA		0,97	0,11	0,14	0,20
Σ MUFA		39,6	35,2	24,5	22,8
Σ PUFA		11,1	54,6	63,1	60,8
Σ LCFA		–	24,6	1,9	5,1

The wild-type strain *C. necator* B-10646 was grown in batch culture in short-duration experiments (48 h) on plant oils as sole carbon source (Fig. 1). Bacterial cells grown on plant oils that differed in the FA composition and percentages had diverse production parameters, including cell concentrations and intracellular polymer contents.

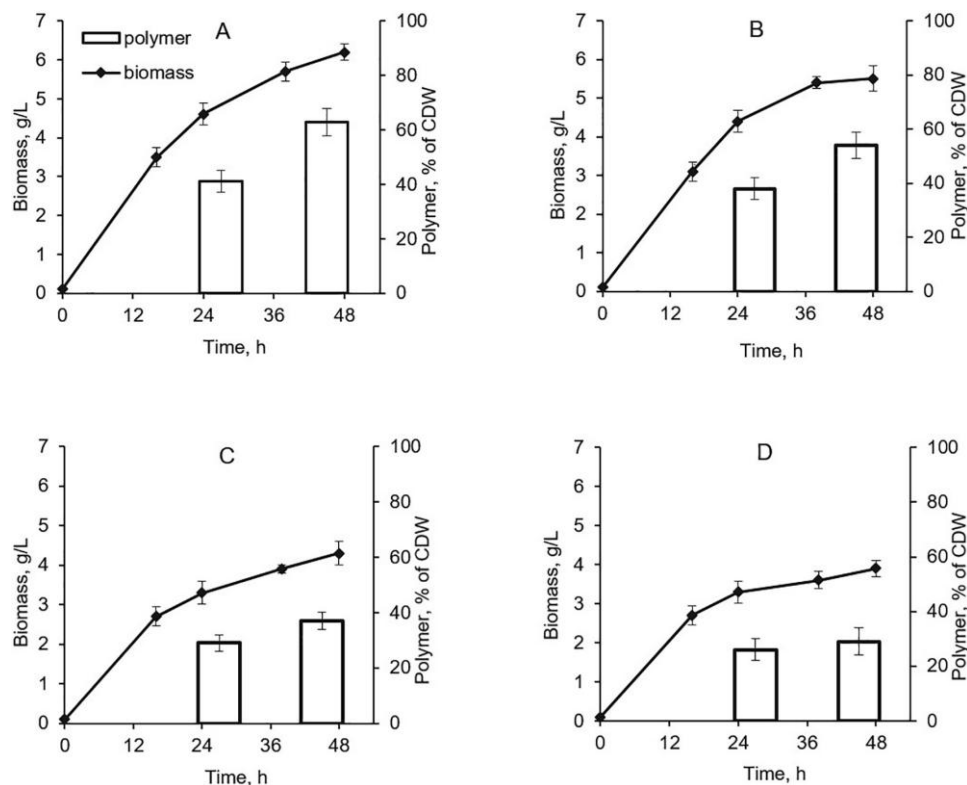


Fig. 1. Cell concentrations and PHA production by *C. necator* B-10646 grown on plant oils: A – palm oil, B – Siberian oilseed oil, C – refined sunflower seed oil, D – unrefined sunflower seed oil

Yield coefficients of *C. necator* B-10646 cultures based on cell concentrations and polymer contents differed significantly. In the experiment with palm oil, biomass yield coefficient (Y_x) was $0,75 \pm 0,03$ g biomass/g oil and polymer yield coefficient (Y_p) was $0,48 \pm 0,02$ g polymer/g oil. The parameters obtained on Siberian oilseed oil were comparable with those obtained on palm oil: $Y_x = 0,76 \pm 0,03$ g biomass/g oil and $Y_p = 0,42 \pm 0,02$ g polymer/g oil. In the experiment with refined and unrefined sunflower seed oil, polymer yield coefficient was considerably lower – $0,28 \pm 0,02$ and $0,22 \pm 0,01$ g polymer/g oil, respectively, while biomass yield coefficients were similar to those obtained for palm and Siberian oilseed oils: $Y_x = 0,74 \pm 0,02$ and $0,75 \pm 0,03$ g biomass/g oil.

As the use of palm oil as growth substrate for bacterial cells is known to favor incorporation of monomers other than 3-hydroxybutyrate into PHA, but may result in a considerable decrease in molecular weight of the polymer (from 500 000 to 300 000 kDa) and an increase in polydispersity [4], a study

was conducted to analyze the composition and molecular-weight properties of PHA specimens synthesized from plant oils (Table 2).

Table 2

Characteristics of polymer synthesized by *C. necator* B-10646 at different substrates at the end of cultivation

Substrate	Polymer composition mol.%			M_n , kDa	M_w , kDa	\bar{D}
	3HB	3HV	3HHx			
Fructose	100	-	-	220	750	3,4
Palm oil	97,2	1,9	0,9	130	670	5,2
Refined sunflower seed oil	97,5	1,5	1,0	190	780	4,1
Unrefined sunflower seed oil	97,5	1,5	1,0	170	740	4,4

The strain *C. necator* B-10646 on plant oils, the cells synthesized a terpolymer, which contained not only the dominant 3HB (97–99 mol.%) but also monomers of 3-hydroxyvalerate (0,9-1,9 mol.%) and medium-chain-length 3-hydroxyhexanoate (0,4–1,3 mol.%). No significant changes in the molecular weight of the polymers were detected. The M_w of the polymer synthesized by bacterial cells from all oils was 670-780 kDa; the minimum value was obtained at palm oil. However, the polydispersity of the polymer increased significantly and reached 4–5.

Conclusion

The study showed that the best carbon substrates were palm and Siberian oilseed oils. All PHA specimens were terpolymers that contained 3-hydroxybutyrate as the major component and minor amounts of 3-hydroxyvalerate (0,9–1,9 mol.%) and 3-hydroxyhexanoate (0,5–1,1 mol.%). Molecular weight of PHA specimens depended on plant oil and emulsifier.

References

1. Ng, K.S., Ooi, W.Y., Goh, L.K., Shenbagarathai, R., Sudesh, K., 2010. Evaluation of jatropha oil to produce poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 1365-1369.
2. Budde, C.F., Riedel, S.L., Hübner, F., Risch, S., Popović, M.K., Rha, C., Sinskey, A.J., 2011a. Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1611–1619.
3. Budde, C.F., Riedel, S.L., Willis, L.B., Rha, C., Sinskey, A.J., 2011b. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2847–2854.
4. Riedel, S.L., Bader, J., Brigham, C.J., Budde, C.F., Yusof, Z.A.M., Rha, C., Sinskey, A.J., 2012. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 74–83.

ЖИРОСОДЕРЖАЩИЕ ОТХОДЫ РЫБОКОНСЕРВНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ СИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

В. В. Волков¹, Н. О. Жила^{2,3}, А. С. Мустафин², Е. Г. Киселев^{2,3}

¹*ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»*

²*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036, Россия, Красноярск,
Академгородок. 50/50,*

³*Сибирский федеральный университет,
660041, Россия, Красноярск, просп. Свободный, 79*

Увеличение объемов промышленного производства и повышение эффективности невозможно без интенсификации. Это предполагает совершенствование технологий и организации производства и более эффективного использования сырьевых ресурсов. Одним из наиболее важных путей рационального использования сырьевых ресурсов является их комплексная переработка, при этом создается возможность сбора образуемых отходов с последующей переработкой их по целевому назначению в зависимости от происхождения и химического состава. В пищевой промышленности существенной проблемой является отсутствие рациональной технологии переработки накапливающихся жиросодержащих отходов. Эта проблем актуальна и для рыбоперерабатывающей промышленности в связи с тем, что в процессе переработки рыбного сырья более 50 % идет в отходы, значительная часть которых уносится с промывной водой, что оказывает существенное влияние на характеристику сточных вод, приводит к образованию специфических осадков и создает экологические проблемы.

Переработка рыбных отходов предполагает применение передовых технологий, необходимых для эффективного решения проблем, возникающих при утилизации рыбного сырья. Ресурсная составляющая рыбных отходов в настоящее время используется недостаточно. Актуальным направлением исследований является поиск новых технологий переработки отходов не только для рутинного получения рыбной муки и жиросодержащих продуктов технического назначения, но также и более востребованных продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Цель работы – оценка жиросодержащих отходов рыбоконсервной промышленности в качестве С-субстрата для синтеза разрушаемых полигидроксиалканоатов (ПГА).

Материалы и методы

Исследовано шпротное масло, полученное в процессе экстракции жира из шпротных голов при температуре от 60° до 90 °С и выдержке в течение 10–15 минут, которые в настоящее время являются отходом про-

изводства шпрот в масле из балтийской кильки (*Sprattus sprattus*). Копчение балтийской кильки осуществляли в коптильной печи на ольховых опилках при температуре ниже 115 °С, в течение 15–20 минут. Потом кильку охлаждали, снимали с прутков и обрезали головы. Собранное масло использовали в качестве С-субстрата, добавляемого в состав питательной среды для выращивания бактерий *Cupriavidus necator* В-10646. Исходный состав масла, его жирнокислотный состав и динамика ЖК в процессе утилизации масла бактериями анализировали стандартными методами липидологии с применением хроматографии. Регистрировали полученный урожай биомассы бактерий в культуре (X , г/л), содержание, состав и отдельные свойства ПГА.

Результаты

В составе шпротного масла определены липиды (95 %), белки (4 %) и углеводы (1 %). В составе жирных кислот липидов исходного шпротного масла (см. табл. 1) идентифицировано 16 жирных кислот. Среди доминирующих ЖК – пальмитиновая (28 %), олеиновая (25,3 %), докозагексаеновая (16,7 %), а также тимнодоновая (8,7 %); содержание остальных жирных кислот было низким, от менее 1 % до 3–4 %.

Таблица 1

Жирнокислотный состав исходного шпротного масла

Индекс ЖК	Название	Содержание, %
14:0	Миристиновая	3,5
15:0	Пентадекановая	0,5
16:0	Пальмитиновая	28
16:1 (омега-9)	Пальмитинолеиновая	0,3
17:0	Маргариновая	0,1
18:0	Стеариновая	4,5
18:1 (омега-9)	Олеиновая	25,3
18:2 (омега-6)	Линолевая	2,5
18:3 (омега-3)	Линоленовая	4,3
20:0	Арахидиновая кислота	0,3
20:1	Эйкозеновая	1
20:2	Эйкозодиеновая	0,4
20:5 (омега-3)	Тимнодоновая	8,7
22:0	Бегеновая кислота	0,5
22:6 (омега-3)	Докозагексаеновая	16,7
24:1	Нервоновая	1,5
Другие		1,2

В процессе культивирования жирные кислоты утилизировались культурой бактерий неравномерно и с преимущественным потреблением линоленовой (18:3); тимнодоновой (20:5); докозагексаеновой (22:6) кислот, концентрация которых к концу процесса (72 ч) упала многократно, в 10

и более раз. В остаточном липидном субстрате резко сократилось содержание полиненасыщенных и моноеновых длинноцепочечных жирных кислот; остаточные насыщенные кислоты дальнейший рост клеток не обеспечивало. Продолжение процесса роста бактерий было возможно только при реализации режима культивирования с подпиткой субстратом при дополнительном внесении в культуру новых порций масла.

Исследовано влияние концентрации масла на продукционные показатели культуры бактерий. Варьирование концентрации масла в среде от 10 до 40 г/л, показала, что самый высокий урожай биомассы бактерий за 48–50 ч (4,3–4,5 г/л) получен в диапазоне 15–25 г/л. Выход полимера в этом диапазоне концентрации масла в культуре составил порядка 62–65 %. Синтезированный полимер представляет собой трехкомпонентный сополимер мономеров 3-гидроксипропаната, 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата. Удлинение процесса культивирования до 72 ч не влияло на урожай биомассы бактерий в культуре, но повышало до 71,1 % внутриклеточную концентрацию полимера.

Сополимер, синтезированный при нелимитированной подаче в культуру исследуемого липидного С-субстрата, имел значения среднемолекулярной массы от 670 до 760 кДа при повышенных значениях полидисперсности (5,7); степень кристалличности определена на уровне 66–72 %.

Заключение

По результатам первичной оценки, масло, полученное из голов балтийской кильки (*Sprattus sprattus*), отходов производства шпрот, можно отнести к перспективному субстрату для биотехнологического получения биоразрушаемых «зеленых» пластиков – полигидроксиалканоатов.

PROPERTIES OF FILMS FROM DEGRADABLE PHAS OF DIFFERENT MONOMER COMPOSITIONS *

T. Volova^{1,2}, E. Kiselev^{1,2}, A. Dudaev^{1,2}, I. Nemtsev^{1,3,4},
A. Lukyanenko^{1,4}, A. Sukovatyi^{1,2}, G. Ryltseva¹, E. Shishatskaya^{1,2}

¹Siberian Federal University, 79 Svobodnyi av., Krasnoyarsk, 660041, Russia

²Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, 50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

⁴L. V. Kirensky Institute of Physics, 50/12 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Modern biotechnology offers tools for fabricating a wide range of target products, including novel environmentally safe highly marketable biomaterials. The most promising area of application for biomaterials is medicine, which urgently needs biocompatible materials for producing medical instruments, drug delivery systems, implants, and bio-constructors of organs and tissues in cell and tissue engineering. The discovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) – biodegradable microbial polymers – was a notable event for biotechnology of novel materials. Potential areas of application of these polymers are very wide: reconstructive medicine, pharmacology, agriculture, municipal engineering, communications electronics, etc. A promising line of PHA research is associated with application of these polymers in cell and tissue engineering. PHAs have great potential as materials for regenerating damaged skin, repairing the defects of soft tissues, bones, blood vessels, heart valves, etc.

The purpose of this study was to investigate the structure and properties of the polymer films fabricated from the unique set of PHA bipolymers, terpolymers, and quaterpolymers composed of various monomer fractions.

Material and Methods

Polymers (PHAs) composed of 2, 3, and 4 monomers were synthesized using the *Cupriavidus necator* B-10646 strain, and polymer films prepared from them by casting chloroform solutions (1–2 %) heated to 35 °C on degreased glass and subsequent drying for 48 h in a dust-free box. The present study was the first to investigate surface microstructure and physical/mechanical properties of the films made from PHA copolymers with widely diverse chemical compositions as dependent on their monomer composition.

Results

A family of two-, three-, and four-component PHAs with various amounts and ratios of monomers has been synthesized (Table). All copolymers had de-

© Volova T., Kiselev E., Dudaev A., Nemtsev I., Lukyanenko A., Sukovatyi A., Ryltseva G., Shishatskaya E., 2021

* The part of the reported study on polymer synthesis and examination was funded by RFBR and KKRF Grant No. 19-43-240012 “Biological and physical principles of production of new generation biomaterials”. The work on production and investigation of polymer films was carried out as part of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. FSRZ-2020-0006.

creased weight average molecular weights, M_w (to 390-600 kDa), and increased values of polydispersity (3,2-4,6) compared to the P(3HB) homopolymer. PHA copolymers retained thermostability, and the difference between T_{melt} and T_{degr} was at least 100–120 °C. Incorporation of 4HB, 3HV, and 3HHx monomer units into the 3-hydroxybutyrate chain caused changes in the amorphous to crystalline ratio and decreased the degree of crystallinity (C_x) to 20–40 %. According to the degree to which the monomers reduced crystallinity, they were ranked as follows: 4HB–3HHx–3HV.

Table 1
Composition and physicochemical properties of different PHAs:
3-hydroxybutyrate homopolymer; bi-, ter-, and quaterpolymers

Sample	PHA composition, mol.%			M_w , kDa	D	C_x , %	T_g , °C	T_c , °C	T_{melt} , °C	T_{degr} , °C	
3-hydroxybutyrate homopolymer P(3HB)											
1	100,0			920	2,5	78	-	85	170	280	
Copolymers											
P(3HB/3HV)											
2	89,8	10,2		826	1,8	76	-0,9	52,5 57,5	163,9	277,8	
3	85,0	15,0		690	2,8	65	-1,0	64,2	133,4	272,1	
4	72,8	27,2		576	3,2	54	-1,9	78,1	162,5	275,9	
5	35,0	65,0		398	3,44	58	-4,4	57,0	148,6	278,6	
P(3HB/4HB)											
6	64,5	35,5		660	3,6	22	-9,5	58,5	165,5	278,4	
7	24,8	75,2		840	3,8	16	-3,6	57,7	164,3	265,3	
8	86,0	14,0		715	2,9	44	-11,7	68,2	161,4	272,3	
P(3HB/3HHx)											
9	62,0	38,0		486	3,7	52	-1,6	71,2	169,2	260,1	
10	83,6	16,4		390	4,3	49	-0,6	57,2	168,7	281,5	
11	91,0	9,0		520	3,9	60	-0,2	63,2	170,2	262,7	
Terpolymers											
P(3HB/3HV/3HHx)											
12	55,0	29,3	15,7	459	3,4	32	-0,1	60,2	166,4	264,6	
13	57,6	21,9	20,5	548	4,2	21	0,5	59,5	165,3	267,1	
14	49,4	27,2	23,4	360	3,8	28	-7,0	55,7	165,0	286,4	
P(3HB/3HV/4HB)											
15	55,0	28,6	16,4	570	3,0	35	-1,7	53,2	167,0	284,0	
16	56,2	13,4	30,4	620	4,1	28	-5,7	59,8	170,4	280,0	
Quaterpolymers											
P(3HB/3HV/4HB/3HHx)											
17	61,4	19,4	14,0	5,2	542	3,7	37	1,2	59,9	167,2	282,6
18	73,5	17,6	6,4	2,5	479	4,6	40	-4,6	70,2	170,6	284,4

A unique set of films was produced; their surface properties and physical/mechanical properties were studied as dependent on PHA composition; monomers other than 3-hydroxybutyrate were found to enhance hydrophilicity, surface development, and elasticity of polymer films. The films were similar in thickness ($298,94 \pm 12,79 \mu\text{m}$) but considerably different in morphology (Figure). All copolymer films were more porous than the dense and virtually pore-free film prepared from the P(3HB) homopolymer (on which there were a few pores $1,0 \mu\text{m}$ in diameter or smaller). The number and sizes of pores on copolymer films varied considerably, regardless of the PHA composition. Hydrophilic/hydrophobic balance of the surface is a major parameter that indirectly characterizes hydrophilicity of the film and affects cell adhesion and viability. The hydrophilic/hydrophobic balance is estimated by measuring contact angle for liquids. Water contact angle of the film prepared from the high-crystallinity P(3HB) reached 92° , and the calculated values of surface energy and its dispersion and polar components were 30,8, 28,6, and 2,3 mN/m, respectively. At the same time, water contact angles of copolymer films were lower although the decrease ranged between 10 and 100%. As the values of water contact angle differed greatly, it was impossible to establish any definitive relationship between the concentrations of different monomers in copolymers and the value of water contact angle. Films of bi- and terpolymers containing 3HHx had the smallest contact angles (up to 48° – 56°), and water contact angles of the films made from copolymers containing 3HV and 4HB reached 60° – 79° .

The important parameter of polymer products is physicochemical reactivity of the surface. Nanometer roughness determines protein adhesion, cell attachment, growth, and synthesis of specific proteins. Examination of polymer films using atomic force microscopy showed the effect of the chemical composition of PHAs on surface roughness. The polymer specimen prepared from the P(3HB) homopolymer had the lowest arithmetic mean surface roughness (R_a) and root mean square roughness (R_q) – 154 and 180 nm, respectively. Most of the films prepared from PHA copolymers had higher R_a and R_q values.

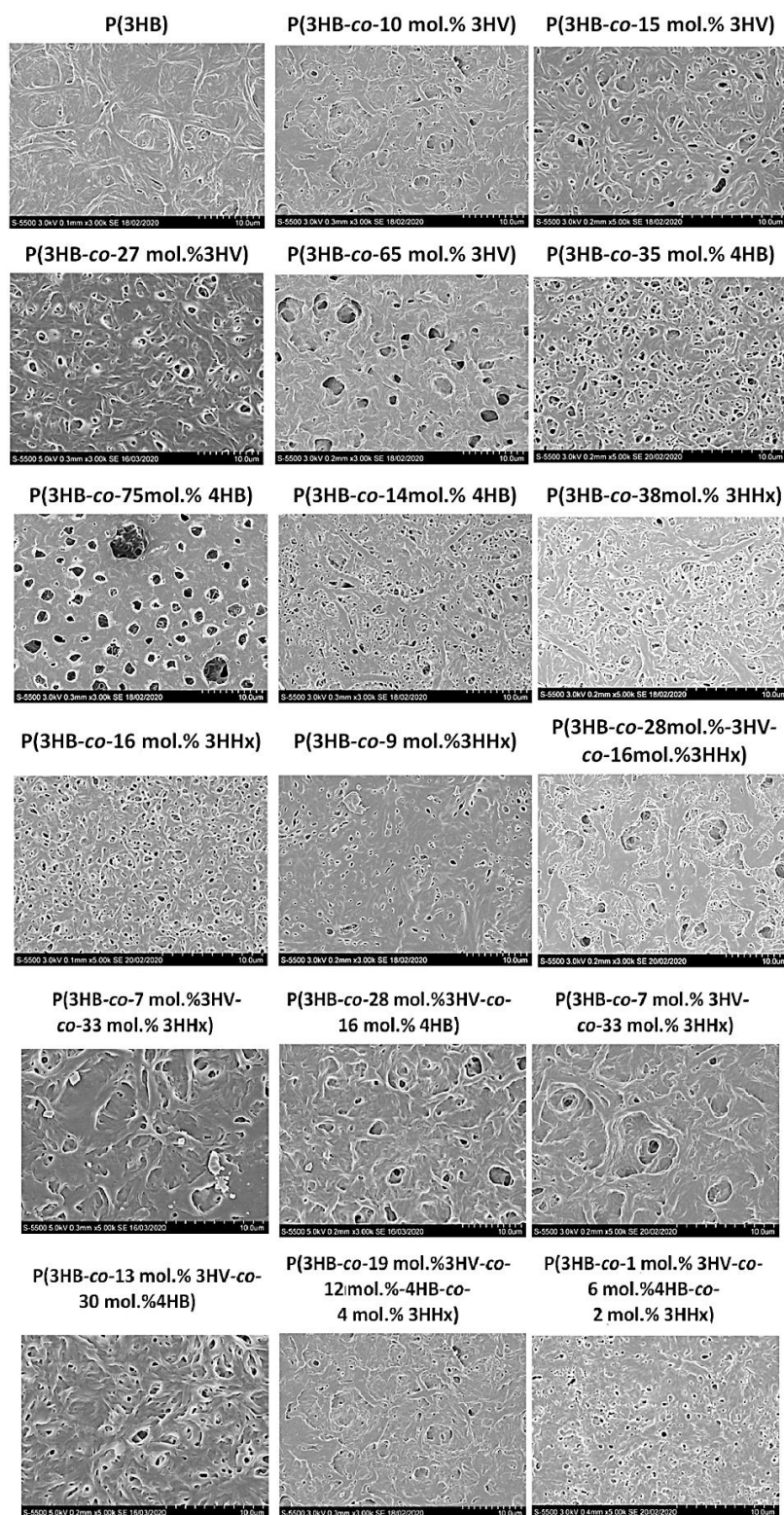


Fig. 1. SEM images of films prepared from PHAs with different compositions. Bar = 10 µm

The study of physical/mechanical properties of the films showed that copolymer films were inferior to P(3HB) films in their mechanical strength. The parameters of strength (tensile strength and Young's modulus) of P(3HB) films were 18,9 and 2034 MPa, respectively, while elongation at break (the parameter of elasticity) was very low – 3,1 %. All copolymer films exhib-

ited considerably decreased values of tensile strength (between 11–12 and 7–6 МПа) and Young's modulus (between 1 420 and 1 180 МПа). However, films are generally characterized by rather low mechanical strength. An essential effect of PHA composition was enhanced elongation at break, which was higher by one and a half to two orders of magnitude in copolymers. That is, copolymer films had enhanced elasticity – an important property for films.

Conclusions

The present study was the first to investigate surface microstructure and physical/mechanical properties of the films made from PHA copolymers with widely diverse chemical compositions as dependent on their monomer composition. Copolymer films exhibited enhanced elasticity and an increase in elongation at break by two to three orders of magnitude (to 100–300 % compared with 2–3 % in P(3HB)), but their mechanical strength, measured as tensile strength and Young's modulus, decreased. Monomer units other than 3-hydroxybutyrate were found to enhance film surface hydrophilicity and development. Results obtained in the present study contribute to the solution of a critical issue of producing degradable functional polymer materials.

Acknowledgments

The authors would like to express their special thanks to Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS» for providing equipment to ensure the accomplishment of this project.

МИКРОСТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПЛЕНОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПГА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НОВЫМ ШТАММОМ *S. NECATOR* IBN-21 НА РАЗЛИЧНЫХ С-СУБСТРАТАХ

Н. Жила^{1,2}, К. Сапожникова^{1,2}, И. Немцев^{3,4}

¹Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

²Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50

³ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/1

⁴Институт физики им. Л. В. Киренского, ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/12

Анализ литературы по физико-химическим свойствам ПГА показывает, что опубликованные данные имеют существенные отличия молекулярно-массовых и температурных характеристик даже при анализе образцов близкого химического состава. Разброс показателей можно связать с тем, что разными авторами были исследованы различные штаммы и типы С-субстратов, образцы полимеров были отобраны из различных фаз культуры, а также использованы различные способы экстракции и очистки полимеров и др., следовательно, эти факторы следует учитывать при изучении свойств ПГА и изделий из них. Также неоднозначны данные о том, как базовые свойства ПГА изменяются в зависимости от состава среды и условий выращивания микроорганизмов, и как эти изменения влияют на свойства получаемых полимерных изделий.

Вместе с тем имеются отдельные результаты, свидетельствующие о влиянии характеристик ПГА на свойства полимерных изделий из них. Например, показано, что набор и соотношение мономеров в ПГА влияют на микроструктуру и свойства поверхности полимерных пленок [1], биологическую совместимость по отношению к клеткам крови [2]. Установлено, что замена в составе среды глюкозы растительными маслами, в составе которых присутствует глицерин, сопровождается не только изменением молекулярной массы и кристалличности П(ЗГБ) [3], но также значительно влияет на структуру и свойства нетканых мембран, полученных электростатическим формованием [4–5].

Цель работы – исследование микроструктуры и свойств поверхности пленок, полученных из ПГА, синтезированных на различных С-субстратах.

Материалы и методы

Пленки получали поливом 2%-раствора полимера в дихлорметане в обезжиренные формы с тефлоновым покрытием и высушивали до полного испарения растворителя в шкафу с ламинарным потоком (Labconco, США) на 72 ч. Микроструктуру поверхности пленок ПГА анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии (растро-

вый электронный микроскоп высокого разрешения FE-SEM S 5500 Hitachi, Япония). Пористость пленок определена по изображениям, полученным с помощью РЭМ с использованием пакета программного обеспечения для анализа цифровых изображений (Image J v 1.52). Краевые углы поверхности пленок исследовали на приборе Drop Shape Analyzer – DSA-25E (Krüss, Германия) с использованием программы DSA-4 для Windows.

Результаты

На рис. 1–2 представлены результаты исследования пленок, полученных из ПГА в культуре *S. necator* IBP-21 на различных С-субстратах. Зарегистрированные отличия микроструктуры поверхности пленок иллюстрируют РЭМ-снимки (рис. 1), на которых видны отличия морфологии поверхности.

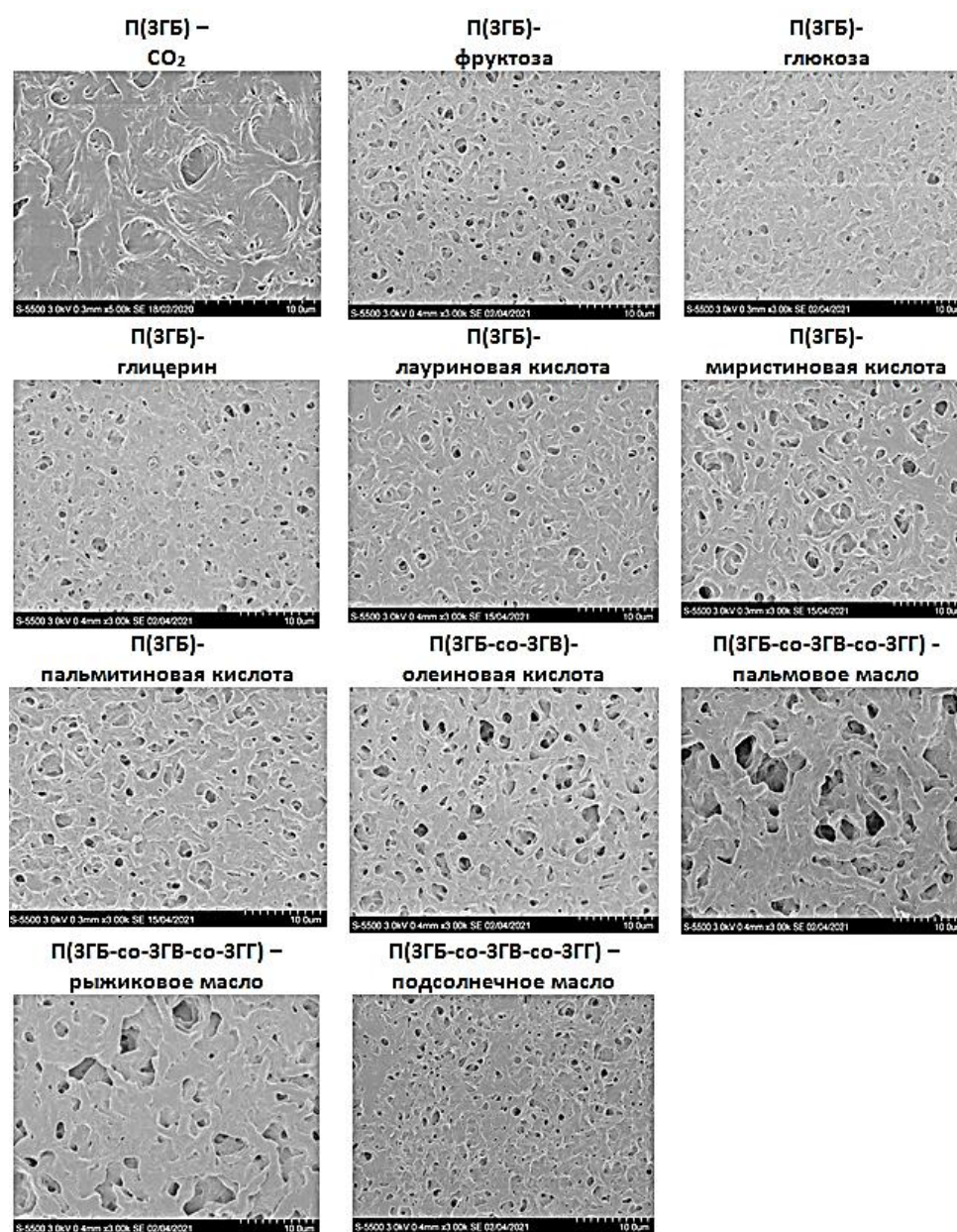


Рис. 1. РЭМ-снимки пленок, полученных из ПГА, синтезированных *S. necator* IBP-21 на различных С-субстратах

При анализе пористости обнаружено, что поверхность пленок, полученных из ПГА, синтезированных на различных С-субстратах, имеет значительные отличия в количестве пор и еще более различающиеся по размерам поры. Это, по всей видимости, связано с различиями кинетики кристаллизации в процессе формирования пленок по мере их высыхания и испарения растворителя. Сравнение пористости пленок, полученных из одного типа ПГА – поли-3-гидроксibuтирата, показало, что количество пор было в принципе у всех 7-ми образцов близким и лежало в диапазоне 32,8–46,5 мкм/1 000 мкм, в отличие от размеров пор, у этих образцов, которые отличались значительно. Так, средняя площадь пор была минимальной, 1,9 и 2,4 мкм у пленок, полученных из П(ЗГБ), синтезированного, соответственно, на глюкозе и лауриновой ЖК. Все сополимерные пленки, за исключением полученных из 3х-компонентного ПГА, синтезированного на подсолнечном масле, отличались более крупными порами. Средняя площадь пор составила 14,0; 21,7 и 24,7 мкм, соответственно, у пленок из сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) синтезированного на олеиновой кислоте; и пленок из П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) на пальмовом и рыжиковом маслах. Эти отличия нашли отражение в интегральном показателе – общей площади пор. Самые низкие значения общей площади пор, 59 и 110 мкм, зарегистрированы у пленок из П(ЗГБ), синтезированного на глюкозе и лауриновой кислоте, а также на образце из подсолнечного масла (80 мкм). Площадь пор у сополимерных пленок была в несколько раз выше; самые высокие значения (690 и 874 мкм) были у пленок из П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ), синтезированных на рыжиковым и пальмовом растительных маслах. Таким образом, ПГА, синтезированные на различных С-субстратах, различающиеся составом мономеров, обеспечивают возможность получения наливных пленок с различной пористостью.

Используемый для синтеза ПГА С-субстрат, как оказалось, не оказывал влияние на величину краевого угла смачивания, который является косвенным показателем гидрофильности поверхности. Величина угла у всех образцов пленок была близкой (рис. 2). Пленки, полученные из образцов П(ЗГБ), синтезированных на глюкозе, глицерине, а также на ЖК, имели практически одинаковую величину угла.

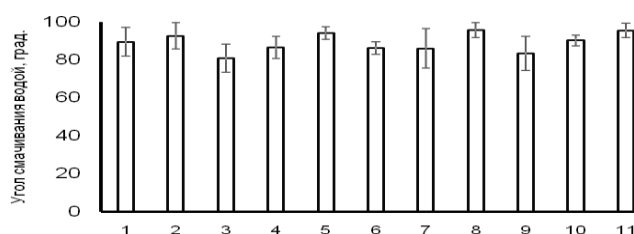


Рис. 2. Показатели краевого угла поверхности пленок, полученных из ПГА, синтезированных *S. necator* ИВР-21 на различных С-субстратах: 1 – CO₂; 2 – глицерин, 3 – фруктоза; 4 – глюкоза; 5 – лауриновая кислота; 6 – миристиновая кислота; 7 – пальмитиновая кислота; 8 – олеиновая кислота; 9 – пальмовое масло; 10 – рыжиковое масло; 11 – подсолнечное масло

Отмеченные несколько сниженные значения краевого угла смачивания для пленок, полученных из П(ЗГБ), синтезированных на фруктозе и сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-ЗГГ), синтезированного на пальмовом масле, соответственно, $80,8 \pm 17,33^\circ$ и $83,3 \pm 8,95^\circ$, оказалось не достоверным (при уровне значимости $\alpha = 0,05$). Аналогично величине угла поверхности пленок, полученных из гомополимера П(ЗГБ), отмеченные незначительно повышенные значения угла для пленок из сополимерных ПГА, синтезированных на подсолнечном масле и олеиновой кислоте ($95,5\text{--}95,7^\circ$), также статистически не достоверно. Таким образом, все типы пленок, полученные из образцов ПГА, синтезированных *C. necator* IBP-21 на различных С-субстратах, имеющие близкие значения степени кристалличности и температурные показатели, не имели достоверных отличий по величине краевого угла смачивания водой.

Заключение

Исследовано семейство полимерных пленок, полученных из ПГА, синтезированных на различных С-субстратах. Для всех типов ПГА, независимо от использованного С-субстрата, определены близкие значения краевого угла. Тип С-субстрата влиял на микроструктуру и пористость поверхности полимерных пленок, включая количество пор и их размеры.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Красноярскому краевому научно-исследовательскому центру ФНЦ «Красноярский научный центр СО РАН» за предоставленное оборудование для электронных микроскопических исследований.

Список литературы

1. E. Shishatskaya, I. Nemtsev, A. Lukyanenko, A. Vasiliev, E. Kiselev, A. Sukovatyi, T. Volova, Polymer Films of Poly-3-hydroxybutyrate Synthesized by *Cupriavidus necator* from Different Carbon Sources, J. Polym. Environ. 2021, 29(3), 837–850.
2. E.I. Shishatskaya, N.G. Menzhanova, A.A. Shumilova. The effect of the chemical composition and structure of polymer films made from resorbable polyhydroxyalkanoates on blood cell response // International Journal of Biological Macromolecules 2019, 141(1), 765–774.
3. Taniguchi, K. Kagotani and Y. Kimura, “Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils,” Green Chemistry, 2003, 5, 545–548,
4. Irorere; V.; Bagheriasl, S.; Blevins, M.; Kwiecien, I.; Stamboulis, A.; Radecka, I. Electrospun Fibres of Polyhydroxybutyrate Synthesized by *Ralstonia eutropha* from Different Carbon Sources. Int. J. Polym. Sci. 2014, 705359.
5. Ye, H.; Zhang, K.; Kai, D.; Li, Z.; Loh, X.J. Polyester elastomers for soft tissue engineering. Chem Soc Rev. 2018, 47, 4545–4580.

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРОВАННОЙ ПРОДУЦЕНТОМ *KOMAGATAEIBACTER XYLINUS* B-12431 НА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ МИСКАНТУСА И ШЕЛУХИ ОВСА *

Л. А. Алешина¹, Е. К. Гладышева²,
В. В. Будаева², Е. А. Скиба², Г. В. Сакович²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», Россия, 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, просп. Ленина, д. 33; e-mail: rectorat@petrsu.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, 1, Россия, 659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1; e-mail: ipcet@mail.ru

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) имеет отличительные свойства, которые превосходят свойства растительной целлюлозы. К таким свойствам можно отнести ее структурные характеристики, а именно высокую степень кристалличности и высокое содержание алломорфа *Ia* в образцах. Именно преимущественное содержание алломорфа *Ia* позволяет идентифицировать микробиальное происхождение целлюлозы [1]. Однако структурные характеристики образцов БНЦ могут изменяться под действием различных факторов в процессе биосинтез БНЦ. К одному из таких факторов можно отнести состав питательной среды [2].

Цель работы – исследование образцов БНЦ, синтезированных разными продуцентами на ферментативных гидролизатах мискантуса и шелухи овса, методом РСА, так как в настоящее время этот метод признан арбитражным [3].

Материалы и методы

Для культивирования продуцента коллекции ВКПМ *Komagataei bacterxylinus* B-12431 использовали питательные среды следующих составов: 1) синтетическая среда Хестрина-Шрамма: глюкоза – 2 %, пептон – 0,5 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, Na_2HPO_4 – 0,27 %, лимонная кислота – 0,115 %; 2) ферментативный гидролизат технической целлюлозы мискантуса, полученной азотнокислым способом [4]; 3) ферментативный гидролизат технической целлюлозы шелухи овса, полученной азотнокислым способом [4]. Биосинтез БНЦ на данных питательных средах проводили в следующих условиях: температура – 30 °С; продолжительность – 14 суток, статический способ культивирования.

Результаты

Получена и исследована серия образцов бактериальной целлюлозы. Дифрактограммы образцов БНЦ были зарегистрированы в двух геомет-

риях: на отражение и прохождение (просвет) на дифрактометре ДРОН-6. Подробно методики расчета рентгеноструктурных характеристик и методика полнопрофильного анализа описаны в [5].

Результаты расчета полученных в геометрии на отражение дифрактограмм методом полнопрофильного анализа показали, что структура всех исследованных образцов преимущественно соответствует алломорфу *I α* , содержание которого изменялось незначительно, от 93,0 % до 94,0 %. Расчет степени кристалличности в геометрии на отражение показал, что данный показатель изменяется от 90,0 % до 94,0 %, а в геометрии на просвет – от 89 % до 100 %.

Заключение

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что при биосинтезе БНЦ состав питательной среды не оказывает влияния на рентгеноструктурные характеристики образцов. Степень кристалличности и содержание алломорфа *I α* в образцах изменяются незначительно в пределах погрешности.

Список литературы

1. Urbina L., Corcuera M. A., Gabilondo N., Eceiza A., Retegi A. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields. // Cellulose. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>.
2. Raiszadeh-Jahromi Y., Rezazadeh-Bari M., Almasi H., Amiri S. Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataei bacterxylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. // J Food Sci Technol. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04289-6>
3. French, A. D. (2020). Increment in evolution of cellulose crystallinity analysis. // Cellulose, 27(10), 5445-5448. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03172-z>
4. Kashcheyeva, E. I., Gismatulina, Y. A., Budaeva, V. V., 2019. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis. Polymers 11(10), 1645. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11101645>
5. Torlopov M. A., Mikhaylov V. I., Udoratina E. V., Aleshina L. A., Prusskii A. I., Nikolay V. Tsvetkov N. V., Krivoshapkin P. V. Cellulose nanocrystals with different length-to-diameter ratios extracted from various plants using novel system acetic acid/phosphotungstic acid/octanol-1 // Cellulose. – 2018. – 25:1031–1046 doi.org/10.1007/s10570-017-1624-z

LASER PROCESSING OF POLYMER FILMS FABRICATED FROM PHAs DIFFERING IN THEIR MONOMER COMPOSITION *

T. G. Volova^{1,2}, A. I. Golubev^{3,4}, I. V. Nemtsev^{1,3,5},
A. V. Lukyanenko^{1,3}, A. E. Dudaev^{1,2}, E. I. Shishatskaya^{1,2}

¹*Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Av., Krasnoyarsk, 660041, Russia*

²*Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

³*L. V. Kirensky Institute of Physics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" SB RAS, 50/38 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

⁴*Special Design and Technological Bureau "Nauka" Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS, 53 Mira Av., Akademgorodok, Krasnoyarsk, 25515, Russia*

⁵*Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" 50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

Properties of polymeric materials, including P(3HB), can be improved by using biological, chemical, and physical methods such as fabrication of P(3HB) composites with other materials, biosynthesis of PHA copolymers, chemical modification and physical treatment of the surface of polymer products. These methods help, more effectively or less effectively, change the properties of polymer products, increase their biodegradation rate, enhance their flexibility and mechanical strength, increase surface hydrophilicity and porosity to facilitate cell attachment, improve gas dynamic properties of the products, and enhance their permeability to substrates and metabolic products of cells and tissues. Laser treatment is a relatively new approach to modification of polymer products. Its main advantage over other treatments is that it modifies the surface selectively, without destroying the material or producing toxic substances.

Laser ablation is widely used today to treat various materials (metals, ceramics, glass, and polymers). Polymers attract considerable interest because of their unique properties such as light weight, corrosion resistance, lower friction properties and less wear compared to metals, and high application potential especially for biomedicine. Laser ablation is the top-down process of removing material by focusing the laser beam onto the material. Ablation occurs only when the material absorbs enough energy to be melted or vaporized.

The aim of the study is to modify the surface of polymeric films made of PHA of various compositions by laser treatment.

© Volova T. G., Golubev A. I., Nemtsev I. V., Lukyanenko A. V., Dudaev A. E., Shishatskaya E. I., 2021

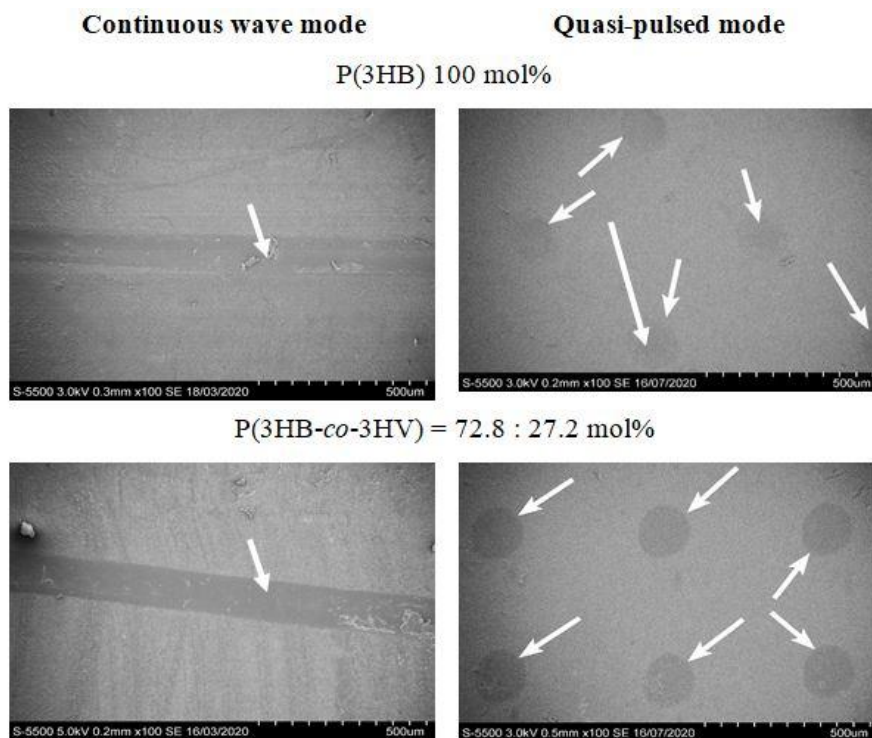
* The part of the reported study on polymer synthesis and examination was funded by RFBR and KKRFF Grant No. 19-43-240012 "Biological and physical principles of production of new generation biomaterials". The work on production and investigation of polymer films was carried out as part of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. FSRZ-2020-0006.

Materials and methods

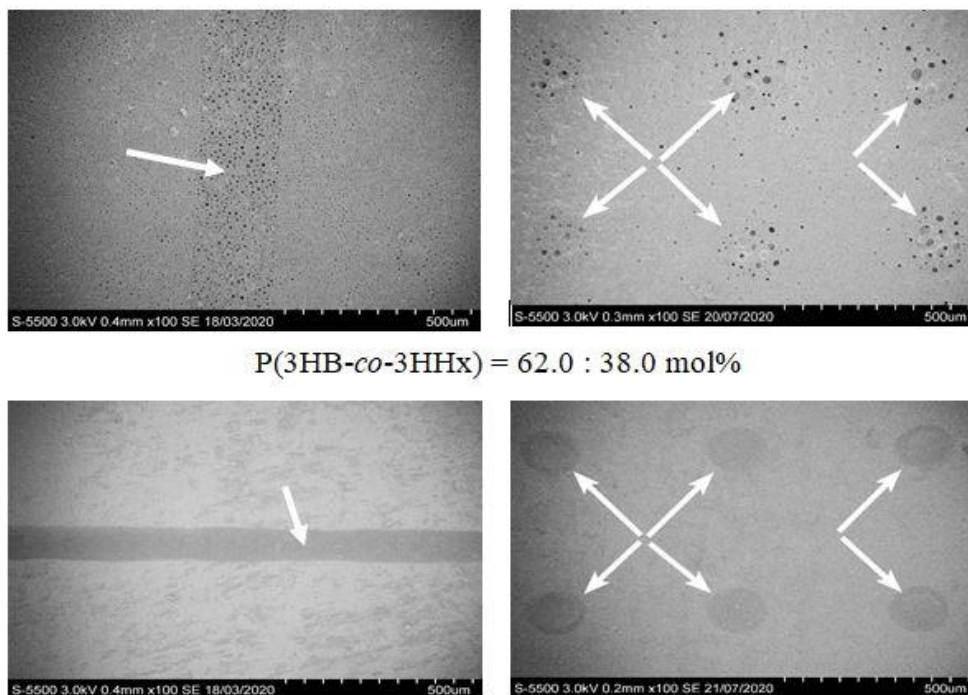
Films were prepared from: poly-3-hydroxybutyrate and three copolymers of 3-hydroxybutyrate: with 4-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 3-hydroxyhexanoate (each second monomer constituting about 30 mol.%). Laser treatment of the surface of flexible transparent polymer films was performed by moderate uniform irradiation of the surface, using CO₂ laser LaserPro Explorer II (Coherent, U.S.). The varied parameters were power and speed of processing and processing modes: in the focused mode, continuous wave treatment was performed linearly (line by line) and in the quasi-pulsed mode, raster engraving (point by point) was used. Power was 3 and 13.5 W; speed was 1 and 2 m/s.

Results

For the first time, the properties of the solvent casting films obtained from PHA of various compositions, processed by a laser in various modes have been investigated. New knowledge has been obtained about the effects of laser treatment of a promising class of biodegradable polymers. Modification of polymer film surfaces in the continuous wave mode causes formation of the melt that cannot be removed by differential vapor pressure, resulting, when the film cools off, in partial sealing of the hollows formed during treatment. Thus, sintered (smoothed) grooves are formed. High-resolution SEM images (bar = 30 μm) show sintered and smoothed regions on the films prepared from PHAs except for the films of P(3HB-co-4HB). On the initially most porous P(3HB-co-4HB) films, numerous pores were formed after laser treatment, and most of them were large (3.0–3.5 μm) (Fig. 1).



$P(3HB-co-4HB) = 64.5: 35.5 \text{ mol}\%$



$P(3HB-co-3HHx) = 62.0 : 38.0 \text{ mol}\%$

Fig. 1. Continue

Polymer films were treated in the vaporization mode. In this mode, the temperature of the material in the exposed region is higher than its melting point, and material is removed in the form of mist. This mode requires the highest specific power consumption, and it is usually performed in the pulsed or quasi-pulsed laser mode. The treatment in the quasi-pulsed mode caused more significant sintering of the copolymer films, on which larger-diameter pits were formed, and their area and the total modified area were greater and inter-pit spacing was smaller than on the more thermostable P(3HB) films (Fig. 1). Like in the experiment with continuous wave treatment, on the initially most porous films of P(3HB-co-4HB), numerous large (2 to 3.0–3.5 μm) pores were formed.

Differences in the modification of the film surface depending on the type of PHA were revealed for each radiation mode. Laser-treated P(3HB) films exhibited a decrease in water contact angle, which was more significant after the treatment in quasi-pulsed mode; roughness parameters were changed by the treatment in both modes. Continuous wave line-by-line irradiation caused formation of sintered grooves on the film surface, which had some change water contact angle (76° – 80°) and reduced roughness parameters (to 40–45 mN/m) for most films. Treatment in the quasi-pulsed raster mode resulted in formation of the pits with no pronounced sintered regions on the film surface, decreased water contact angle more significantly (67° – 76°), and increased roughness of most specimens.

Biocompatibility of cell scaffolds is to a great extent determined by physicochemical reactivity of their surface. The main factors that regulate cell growth and function are scaffold surface topography, roughness, structure, and chemical

and phase compositions. The initial behavior of the cell on the surface largely determines subsequent processes of cell differentiation and proliferation. None of the films, regardless of the PHA composition and treatment mode, had any negative effect on the functional properties of cells relative to the control (polystyrene). None of the films, including laser-treated ones, exhibited cytotoxicity to the NIH 3T3 mouse fibroblast cells. However, the number of viable cells determined in the MTT assay differed depending on both PHA composition and laser treatment mode (Fig. 2).

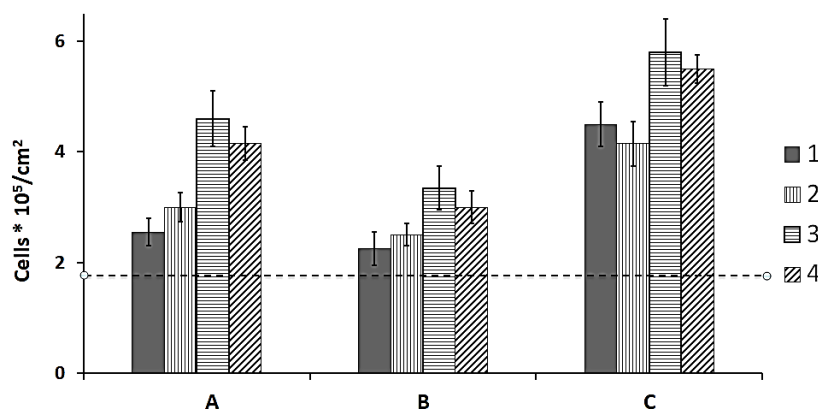


Fig. 2. Numbers of viable cells in MTT assay in the 6-day-old culture of NIH 3T3 fibroblasts on pristine and laser-treated films of PHAs with different composition: 1 – P(3HB); 2 – P(3HB-co-3HV); P(3HB-co-4HB); P(3HB-co-3HHx); A – pristine (non-treated) films; B – continuous wave mode, C – quasi-pulsed mode

Colorimetric test to assess metabolic activity of cells (MTT) assay in NIH 3T3 mouse fibroblast culture showed the number of fibroblasts on the films treated in the continuous wave mode was somewhat lower; treatment in quasi-pulsed radiation mode caused an increase in the number of viable cells by a factor of 1.26 to 1.76, depending on PHA composition. This is an important result, offering an opportunity of targeted surface modification of polymer products aimed at preventing or facilitating cell attachment: e. g., to reduce formation of biofilm on plastic food packaging and vice versa, to stimulate development of cell cultures on films used as cell scaffolds in cellular engineering technologies.

Acknowledgments

The authors would like to express their special thanks to Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS» for providing equipment to ensure the accomplishment of this project.

ПОЛИМЕРНЫЕ 3D-МИКРОСТРУКТУРЫ В БИОЛОГИИ: ОТ МИКРООПТИКИ ДО КЛЕТОЧНЫХ КАРКАСОВ *

**А. В. Писаренко, Д. А. Колымагин,
Д. С. Буркатовский, Д. А. Чубич**

*Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9;
e-mail: mipt.3D@gmail.com*

Технология прямого лазерного письма (DLW) получила широкое применение в биоинженерии и биомедицине для таких целей, как медицинская хирургия, доставка и анализ лекарств [1], а также создании трехмерных каркасов или матриксов (*scaffold*) для клеточных технологий. Основным преимуществом структур, изготовленных в качестве матрикса методом DLW, является возможность создавать любую сложную трехмерную архитектуру с субмикронным разрешением, а также использовать для изготовления структур биосовместимые фоторезисты. Взаимодействие между каркасами, изготовленными методом DLW, и широким спектром клеточных линий, включая нейроноподобные клетки, активно исследуется в настоящее время [2, 3].

Метод прямого лазерного письма (DLW – Direct Laser Writing) основан на процессе двухфотонного поглощения фемтосекундного лазерного излучения молекулами фотоинициатора. Переход молекул фотоинициатора на возбужденный уровень запускает реакцию полимеризации мономера, и при движении лазерного луча относительно подложки позволяет получать полимерные структуры различной сложной топологии. Типичное разрешение данного метода составляет 200 нм в латеральной плоскости и 600 нм в аксиальной. Стоит отметить, что разрешение метода DLW может быть улучшено до 100 нм и менее различными методами, такими как STED [4].

Цель работы – методом DLW изготовление трехмерных микроструктур (полимерные микролинзы на торце оптического волокна), имеющие большие перспективы для использования в качестве микрообъектива эндоскопа.

Результаты

На рис. 1 представлена модель полимерной микролинзы для применений в эндоскопии (А) и изготовленный полимерный каркас (Б) размером ячейки 26 мкм с высеянными клетками линии НЕК293.

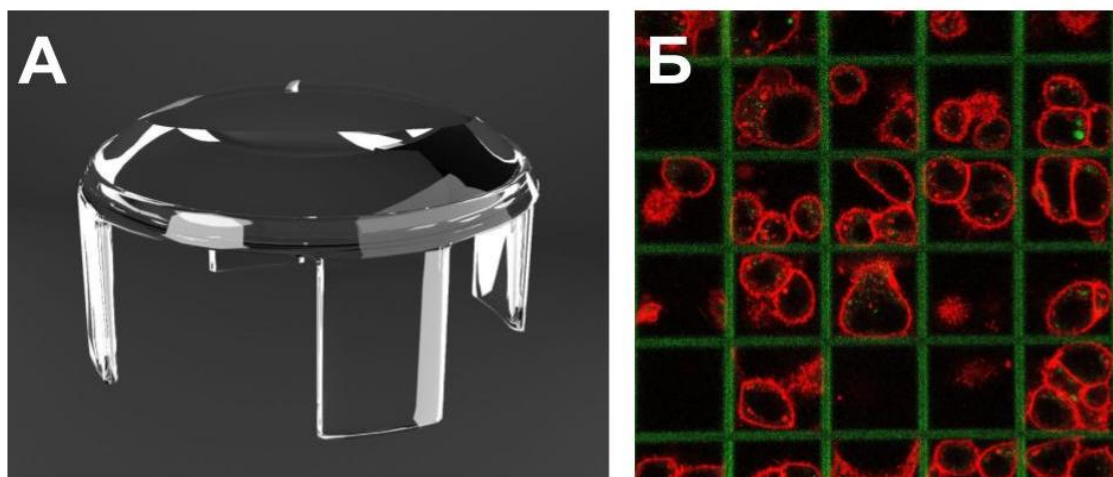


Рис. 1. Модель полимерной микролинзы для применений в эндоскопии (А) и изготовленный полимерный каркас (Б) (зеленый) размером ячейки 26 мкм с высеванными клетками линии НЕК293 (окрашены мембранным красителем, красный); изображение конфокального микроскопа

Для изготовленных микролинз значение среднеквадратичной шероховатости поверхности, определенное методом атомно-силовой микроскопии, составило менее 50 нм. Морфология микролинз также исследовалась методом электронной и атомно-силовой микроскопии. На специальной установке, позволяющей получать и анализировать изображение оптической миры в микролинзах, получены значения размера фокусного пятна и разрешения микролинз. Предложенные микролинзы и массив микролинз, изготовленные непосредственно на многожильном эндоскопическом волокне, возможно использовать в качестве объектива миниатюрного субмиллиметрового эндоскопа для малоинвазивного исследования живых организмов.

Другой пример биологических полимерных структур, изготовленных методом прямого лазерного письма – это полученные клеточные каркасы. Трехмерная форма каркасов с субмикронным разрешением позволяет анализировать поведение высеванных клеток в произвольных трехмерных средах сложной геометрии, что предоставляет много преимуществ по сравнению со стандартными 2D-субстратами. Изготовлены каркасы в виде массива ячеек квадратной формы со стороной от 10 до 30 мкм и высотой от 1 до 30 мкм. На данные структуры посеяны и в течение суток инкубируются клетки линии НЕК293, после чего методом конфокальной микроскопии детально исследовано поведение клеток, в частности возможность клеток проникать внутрь структур. Продемонстрировано, что при малых размерах ячейки все клетки располагаются поверх структур, а при крупных размерах ячейки проникают внутрь структур, частично прикрепляясь к подложке (см. рис. 1). Определен граничный размер ячеек, при котором начинается проникновение клеток в структуры. Для различных клеточных линий данное значение будет отличаться из-за различного инвазивного потенциала [5].

Заключение

Сконструированные технологией прямого лазерного письма (DLW) каркасы пригодны для выделения и исследования единичных клеток и сортировки клеток в зависимости от их инвазивного потенциала.

Список литературы

1. Servant, A., Qiu, F., Mazza, M., Kostarelos, K. and Nelson, B.J. Controlled In Vivo Swimming of a Swarm of Bacteria-Like Microrobotic Flagella // *Adv. Mater.*, 2015, 27: 2981-2988.
2. Marino A., Ciofani G., Filippeschi C. et al. Two-Photon Polymerization of Sub-micrometric Patterned Surfaces: Investigation of Cell-Substrate Interactions and Improved Differentiation of Neuron-like Cells // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013. Vol. 5, no. 24. P. 13012–13021.
3. Klein F., Striebel T., Fischer J. et al. Elastic Fully Three-dimensional Microstructure Scaffolds for Cell Force Measurements // *Advanced Materials*. 2010. Vol. 22, no. 8. P. 868–871.
4. Vitukhnovsky, A.G., Chubich, D.A., Eliseev, S.P. et al. Advantages of STED-Inspired 3D Direct Laser Writing for Fabrication of Hybrid Nanostructures // *J Russ Laser Res*. 2017. 38, 375–382.
5. Spagnolo B., Brunetti V., Lemenager G. et al. Three-dimensional cage-like microcaffolds for cell invasion studies // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5, no. 1.

БИОПОЛИМЕР П(ЗГБ-СО-ЗГВ) ДЛЯ 3D-БИОПЕЧАТИ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ПОСЛОЙНОГО НАПЛАВЛЕНИЯ МАТЕРИАЛА

К. А. Кистерский^{1,2}, А. В. Демиденко¹, Е. Г. Киселев^{1,2},
С. В. Барановский¹, А. Д. Васильев^{3,4}, А. Г. Суковатый^{1,2},
Е. И. Шишацкая^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

²Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр

“Красноярский научный центр”, Россия, 660036, Красноярск, ул. Академгородок 50/50

³Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр”

Россия, 660036, Красноярск, ул. Академгородок 50,

⁴Институт физики им. Л. В. Киренского,

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок 50/12

Аддитивное производство является наиболее активно развивающейся сферой в последнее десятилетие. Использование 3D-принтеров позволяет создавать изделия сложной геометрической формы, обладающие связанной топологией. Ключевым трендом предыдущие 5 лет являлась модификация технологий и процессов 3D-печати, что позволяло расширить возможности применения 3D-принтеров [1]. Наибольшее распространение получила технология послойного наплавления термопластичного материала. Последние годы приоритет исследований всё чаще переходит на сторону использования новых материалов, позволяющих конструировать новые типы изделий во всё больших сферах [2].

Синтетические полимерные материалы стали неотъемлемой частью нашей жизни. Одним из многообещающих материалов, способный заменить многие пластмассы на углеводородной основе, является класс полимеров полигидроксиалканоатов (далее – ПГА). Этот класс обладает рядом ключевых свойств – полная биосовместимость и контролируемая биодеградация, вариабельность молекулярного состава, термопластичность [3]. Биотехнологический процесс синтеза этих полимеров позволяет получать стабильные партии ПГА с заданными характеристиками.

Цель работы

Исследование свойств поверхности, физико-механических характеристик образца из поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата), подготовленного для использования в качестве картриджного материала для серийных 3D-принтеров технологии послойного наплавления материала (FDM).

Материалы и методы

FDM-принтеры используют в качестве картриджного материала прутки термопластичного полимера. В работе использован FDM 3D-принтер Imprinta Hercules (Россия). Для работы этого принтера необходимо полу-

чить гомогенный полимерный пруток диаметром 1,75 мм с отклонением не более 10 %. Для экструзии термопластичного ПГА использован экструдер Brabender Kompaktextruder KE19. Методика изготовления прутка предполагает дегазацию, гомогенизацию и экструзию. Для равномерного плавления и распределения полимерной массы в прутке исполнено 4 цикла плавления-кристаллизации полимера в экструдере.

Для определения структурных изменений на всех стадиях плавления полимерного проведен фазовый анализ с использованием рентгеновского дифрактометра D8 ADVANCE (Bruker, Германия, 2000). Сравнение экспериментальных значений межплоскостных расстояний и относительных интенсивностей с эталонной рентгенограммой позволяет судить об изменениях в структуре полимера. В качестве эталона принят образец, не подвергавшийся термической обработке.

Результаты

Полученные в процессе экструзии полимерные прутки были гомогенны и имели отклонение от необходимого диаметра не более 4 %, а средний диаметр составил 1,76 мм, что попадает в допуски для корректной работы 3D-принтера. В процессе экструзии и получения прутка степень кристалличности полимера увеличилась незначительно с 55 до 61 %, что в целом и свойственно для полукристаллических полимерных материалов. Известно, что для П(ЗГБ) степень кристалличности изменяется в диапазоне 66–78 % [4].

Свойства поверхности напрямую влияют на поведение клеток, их реакцию с этой поверхностью. Используя устройство Kruss (Германия) для оценки краевого угла смачивания полярной и неполярной жидкостью установлено, что при близких значениях краевого угла смачивания энергия поверхностного натяжения и величина сил сцепления выше, а свободная энергия межфазовой поверхности ниже, чем у аналогичного сополимера, полученного с применением растворных технологий (табл. 1). Такая разница может быть объяснена отличием структуры поверхности пленок полученных методом отлива раствора и FDM-изделий.

Таблица 1
 Сравнение краевого угла смачивания разных составов ПГА

Полимер	Контактный краевой угол смачивания водой, град	Поверхностное натяжение, эрг/см ²	Свободная энергия межфазовой поверхности, эрг/см ²	Величина сил сцепления, эрг/см ²
П(ЗГБ)	70,0 ± 0,4	32,8	7,9	97,7
П(ЗГБ-со-37мол.%ЗГВ)	62,5 ± 2,0	38,9	5,3	106,4
П(ЗГБ-со-15мол.%ЗГВ)	66,2 ± 2,5	45,8	1,9	116,7

Окончание табл. 1

Полимер	Контактный краевой угол смачивания водой, град	Поверхностное натяжение, эрг/см ²	Свободная энергия межфазовой поверхности, эрг/см ²	Величина сил сцепления, эрг/см ²
П(ЗГБ-со-7мол.%ЗГГ)	60,9 ± 1,6	42,4	4,1	111,1
П(ЗГБ-со-10мол.%4ГБ)	57,4 ± 0,6	43,1	3,9	112,0

Для исследования физико-механических характеристики и проведения испытаний на разрыв, трехточечный изгиб и сжатие получена и исследована серия полимерных образцов с использованием созданной модели образцов CAD в редакторе Autodesk Inventor 2022, согласно требованиям ГОСТ 11262-2017 «Пластмассы. Метод испытания на растяжение», ГОСТ 4648-71 «Пластмассы. Метод испытания на статический изгиб», ГОСТ 4651-2014 «Пластмассы. Метод испытания на сжатие».

Изготовление образцов методом 3D-печати выполнено по ГОСТ Р 57558-2017 «Аддитивные технологические процессы. Базовые принципы. Часть 1», ГОСТ 57589-2017 «Аддитивные технологические процессы. Базовые принципы. Часть 2» и ГОСТ 12019-66 «Пластмассы. Изготовление образцов для испытания из термопластов».

Физико-механические характеристики исследовали на испытательной машине Instron 5565 с использованием программного обеспечения Bluehill 3 (США) (табл. 2).

Таблица 2

Физико-механические показатели нативной костной ткани

	Модуль упругости, ГПа	Прочность на разрыв, МПа	Прочность на сжатие, МПа
Бедро	17,2	121	167
Большеберцовая кость	18,1	140	159
Малоберцовая кость	18,6	146	129
Плечевая кость	17,2	30	132
Лучевая кость	18,6	149	114
Локтевая кость	18,0	148	117
Шейные позвонки	0,23	3,1	10
Поясничные позвонки	0,16	3,7	5
Губчатая кость	0,09	1,2	1,9

Опираясь на литературные данные о биомеханике костей, можно сделать вывод, что FDM ПГА изделия уступают по прочностным характе-

ристикам предельной нагрузки в 4–6 раз, а по модулю упругости от 5 до 20 раз [5]. Последний показатель очень важен, он говорит нам о том, что напряжение в месте контакта имплантат-кость будет в зоне имплантата, а не костного органа. Это противоположно изделиям из металла и решает проблему их «биомеханического расшатывания».

Полагаем, что постоянная динамическая нагрузка на имплантированную полимерную конструкцию будет способствовать нормальному ремоделированию кости по полимерному шаблону.

Биомеханические свойства костного органа так же определяются комбинацией трабекулярной и кортикальной ткани, следовательно, фактические показания для костного органа имеют отклонения в сторону снижения физико-механической прочности и упругости. Сопоставление физико-механических показателей полученных сополимерных образцов с показателями нативной костной ткани даны в табл. 3.

Таблица 3

Усредненные физико-механические показатели нативной костной ткани
и ПГА образцов

	Тип нагрузки	Максимальная нагрузка, МПа	Модуль Юнга, МПа
Литые образцы ПГА	разрыв	22,43	1,86
	сжатие	65,38	1,86
3D-образцы ПГА	разрыв	41,78	1,17
	сжатие	31,35	1,08
	изгиб	53,96	2,17
Нативная костная ткань	сжатие	133,00	16,10
	разрыв	193,00	22,27
	изгиб	223,80	10,95
	сдвиг	65,30	3,30

Используя точную копию костного органа для создания имплантата возможно внесение внутрь конструкции ребер жесткости, что позволит увеличить общие показатели предельной нагрузки для имплантируемого изделия.

Заключение

Выполненными исследованиями доказано, что физико-механические характеристики исследуемого сополимерного представителя семейства ПГА – сополимера поли(3-гидроксипропаната-со-3-гидроксивалерата), позволяют создавать достаточно прочные изделия, перспективные для реконструкции костной ткани. В процессе изготовления 3D изделия методом многократного термоэкструдирования материал не изменяет своих структурных свойств, а степень кристалличности изменяется незначительно (в диапазоне 55–61 %) на всех стадиях производства. Полимеры семейства ПГА могут пригодны для аддитивных технологий методом FDM 3D-печати в производстве достаточно сложных объемных структур.

Список литературы

1. Urbonaitė G., Kibirkštis E., Miliūnas V. 3D Print Technologies Analysis // *Mechanika*. – 2013.
2. Schniederjans D. G. Adoption of 3D-printing technologies in manufacturing: A survey analysis // *International Journal of Production Economics*. – 2017. – Т. 183. – С. 287–298.
3. Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксиалканоаты-биоразрушаемые полимеры для медицины. – Платина, 2006.
4. Волова Т. Г. и др. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 2013. – Т. 55. – №. 7. – С. 775–775.
5. Morgan E. F., Bayraktar H. H., Keaveny T. M. Trabecular bone modulus–density relationships depend on anatomic site // *Journal of biomechanics*. – 2003. – Т. 36. – №. 7. – С. 897–904.

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНОК ИЗ ПГА РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА *

А. Е. Дудаев^{1,2}, В. И. Турчин¹

¹Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79
²Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50

Для улучшения свойств полимерных материалов возможно применение биологических, химических и физических методов, среди которых – получение композитов с различными материалами, биосинтез полимеров различного химического состава, химическая модификация поверхности полимерных изделий и обработка физическими методами. Применение этих методов с большим или меньшим успехом позволяют влиять на свойства полимерных изделий, ускорять биodeградацию, повышать гибкость и механическую прочность; повышать гидрофильность и пористость поверхности для повышения адгезионных свойств по отношению к культивируемым клеткам, улучшать газодинамические свойства изделий и повышать их проницаемость для субстратов и продуктов обмена клеток и тканей.

Сравнительно недавно для этих целей стали применять лазерную обработку, которая имеет преимущества по сравнению с другими методами, так как позволяет избирательно модифицировать поверхность без разрушения материала и образования токсичных продуктов.

Цель работы – исследование структурных элементов поверхности пленок, полученных из разрушаемых микробных полигидроксиалканоатов (ПГА) различного состава, обработанных CO_2 -лазером в различных режимах.

Материалы и методы

Наливные пленки из ПГА различного состава были обработаны CO_2 -лазером Laser Pro Explorer II (Coherent, США) в постоянном и квазиимпульсном режимах излучения различной мощностью. Показателем модификации поверхности служили результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ); определяли геометрию, размеры и площадь обработанных зон. Для определения глубины и геометрии сформированных модифицированных областей привлечено 3D-профилирование с использованием 3D-микроскопа КН-7700 (Nipox, Япония).

© Дудаев А. Е., Турчин В. И., 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-43-240012р_а (исследование структурных элементов поверхности) и гос. задания Министерства науки и образования РФ № FSRZ-2020-0006 (3D-микроскопия).

Результаты

Исследована микроструктура полимерных пленок из четырех типов ПГА: поли-3-гидроксibuтирата и трех сополимеров: 3-гидроксibuтирата с 4-гидроксibuтиратом или 3-гидроксивалератом, или 3-гидроксигексаноатом.

Для каждого режима выявлены отличия модификации поверхности пленок в зависимости от их состава. При постоянном облучении векторными линиями мощности 3 Вт на поверхности пленок формировались оплавленные области в виде четко выраженных бороздок. Квазиимпульсный режим растровым методом при мощности 13,5 Вт сопровождался образованием лунок без выраженных оплавленных зон. Проведены специальные исследования характера изменений микрорельефа поверхности, формирующегося в результате лазерного излучения. Процесс плавления исследуемых полимеров (ПГА) под действием лазерного луча имел отличия, которые проявлялись в появлении на поверхности пленок дефектов различных типов, их размеров, расстояния между ними, совокупной модифицированной площади (см. табл. 1) и геометрии образующихся элементов (см. рис. 1).

Таблица 1

Характеристика структурных элементов поверхности пленок, полученных из ПГА различного состава, после обработки

Непрерывный режим излучения					
Состав ПГА, мол. %		Ширина полосы, мкм	Расстояние между полосами, мкм		Процент обработки поверхности, %
П(ЗГБ)					
100,0		115,75 ± 5,61	890,18 ± 5,30		11,56 ± 1,03
П(ЗГБ/ЗГВ)					
72,8	27,2	140,19 ± 2,94	891,34 ± 5,85		12,15 ± 1,14
П(ЗГБ/4ГБ)					
64,5	35,5	163,27 ± 6,52	864,17 ± 7,82		15,68 ± 0,67
П(ЗГБ/ЗГГ)					
62,0	38,0	125,10 ± 3,80	889,56 ± 1,87		12,99 ± 0,95
Квазиимпульсный режим излучения					
Состав ПГА, мол. %		Площадь лунки, мкм ²	Диаметр лунки, мкм ²	Расстояние между лунками, мкм	Процент обработки поверхности, %
П(ЗГБ) 100,0		20126,58 ± 1327,99	160,12	342,42 ± 18,56	6,24 ± 0,49
П(ЗГБ/ЗГВ)					
72,8	27,2	27618,06 ± 2679,87	187,57	322,17 ± 21,32	10,07 ± 1,06
П(ЗГБ/4ГБ)					
64,5	35,5	23224,50 ± 2457,80	172,00	335,87 ± 17,72	9,07 ± 0,61
П(ЗГБ/ЗГГ)					
62,0	38,0	21051,48 ± 5055,00	163,76	338,89 ± 24,05	7,64 ± 1,01

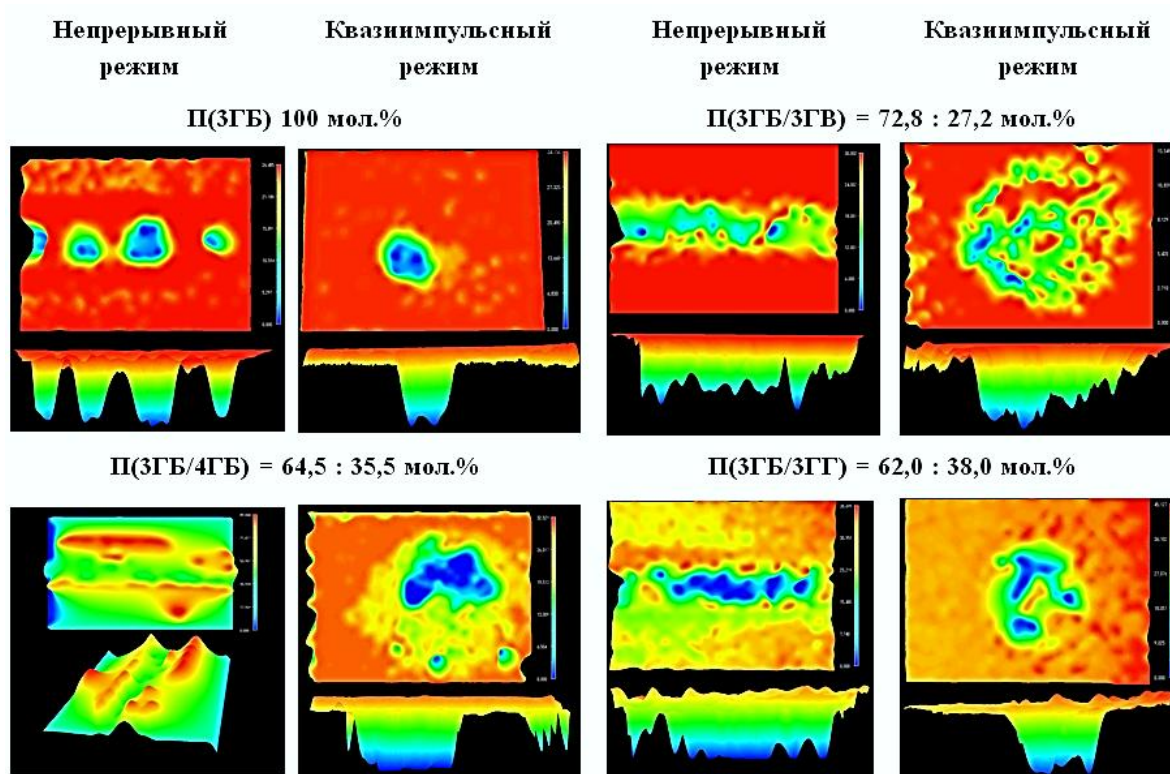


Рис. 1. 3D-микрофотографии поверхностных структурных элементов плёнок из ПГА различного химического состава после обработки лазером

У пленок из гомогенного П(ЗГБ), имеющего самые высокие значения температуры плавления и термической деградации, зона плавления и ширина бороздки при постоянном излучении были самыми узкими 115,75 мкм, соответственно, совокупная модифицированная площадь – наименьшей (порядка 11 % от всей площади). Все типы пленок, изготовленных из сополимерных ПГА с несколько сниженными температурными показателями, имели в области плавления более широкие зоны, поэтому образованные на поверхности пленок бороздки были более обширными (от 123,98 мкм до 163,27 мкм), и совокупная модифицированная площадь была, соответственно, выше, составив от 12,27 % до 15,68 % у разных типов пленок. После квазиимпульсного излучения пленок из П(ЗГБ) мощностью 13,5 Вт диаметр образованных на поверхности лунок составил 159,28 мкм. Это ниже, чем у сополимерных образцов, у которых этот показатель был выше, до 170–180 мкм в зависимости от типа второго мономера. Важно отметить, что совокупная модифицированная площадь в этом варианте обработки была в целом значительно меньше, чем при постоянном излучении; у пленок из П(ЗГБ) составила 6 %; у сополимерных образцов – от 8 до 10 %, за исключение сополимеров с максимальным содержанием 4ГБ (совокупная модифицированная площадь составила 12 %).

Полученные результаты 3D-микроскопии в принципе совпали с данными АСМ, полученными ранее. У гомополимера П(ЗГБ) с наиболее высокой температурой плавления глубина бороздок при непрерывном излучении составила 26,49 мкм, у сополимерных образцов с несколько сни-

женной температурой плавления, бороздки, сформированные в области действия лазерного луча, были глубже, от 30,00 до 34,83 мкм. При квазиимпульсном режиме излучения глубина лунок увеличивалась от 30,74 мкм у термостабильного П(ЗГБ) до 40,61 мкм у менее термопластичного сополимера ЗГБ с мономерами среднецепочечного 2-гидроксигексаноата [П(ЗГБ/ЗГГ)]. У гомогенного П(ЗГБ) в обоих вариантах лазерной обработки отмечена неоднородность лазерного воздействия, выражающаяся в образовании одиночных канавок, не сообщающихся друг с другом, а у сополимерных плёнок, особенно с включением мономеров 3-гидроксигексаноата, наблюдали однородность образованных бороздок и лунок, имеющих четко выраженные границы и объёмную геометрию (см. рис. 1).

Заключение

В связи с различиями исходных свойств ПГА, использованных для получения пленок, включая степень кристалличности, молекулярно-массовые и температурные характеристики, помимо зарегистрированных ранее изменений показателей гидрофильности и шероховатости поверхности, проведены специальные исследования характера изменений микро-рельефа поверхности, формирующегося в результате лазерного излучения. Процесс плавления исследуемых полимеров (ПГА) под действием лазерного луча имел отличия, которые проявлялись в появлении дефектов, образуемых на поверхности модифицированных областей в виде бороздок или лунок, различающихся по геометрическим размерам, расстоянием между ними и совокупной модифицированной площадью, а также характером абляции, выражающимся в объёмной геометрии и однородности полученных структурных элементов.

Список литературы

1. T. Volova, A. Golubev, I. Nemtsev, A. Lukyanenko, A. Dudaev, E. Shishatskaya. Laser processing of polymer films from PHAs different contents. // *Polymers*. – 2021 – Vol. 13(10) – P.1553–1578.
2. T. Volova, E. Kiselev, I. Nemtsev, A. Lukyanenko, A. Sukovaty, A. Kuzmin, G. Ryltseva, E. Shishatskaya. Properties of degradable PHAs with different monomer compositions. // *Int. Biol. Macromol.* – 2021 – Vol. 182 – P. 98–114.
3. Volova, T. G., Tarasevich, A. A., Golubev, A. I., Boyandin, A. N., Shumilova, A. A., Nikolaeva, E. D., Shishatskaya, E. I. Laser processing of polymer constructs from poly(3-hydroxybutyrate). // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2015 – Vol. 26 – P. 1210–1228.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КУПИРОВАНИЯ БИОКОРРОЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ГЕРМОЗАМКНУТОГО ОБЪЕМА МКС (МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ)*

Т. А. Алехова¹, Н. А. Загустина², Т. Ю. Новожилова¹,
А. В. Александрова¹, А. А. Башаров³, А. Д. Плотников³

¹МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119991, Москва

²Институт биохимии им. А. Н. Баха Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, Москва

³Ракетно-космическая корпорация «Энергия» им. С. П. Королёва,
Россия, 141070, Московская обл., Королёв; e-mail: altanj@gmail.com

При длительных космических полетах человека на орбитальных станциях (ОС) на борту космического аппарата обнаруживается широкий спектр самых различных микроорганизмов, способных адаптироваться к условиям станции, обладающих биоповреждающими свойствами по отношению к различным конструкционным материалам.

Мероприятия по защите конструкционных поверхностей в условиях замкнутых обитаемых пространств затруднены из-за токсичности дезинфекционных средств, невозможности последующей промывки поверхностей жидкостью и проветривания.

Наиболее перспективными являются разработки полимерных материалов, содержащих стабильные наноразмерные частицы серебра – особого класса биоцидных агентов, обладающих высокой антибактериальной и фунгицидной активностью.

Цель работы – исследование возможности предотвращения и купирования биокоррозионного повреждения конструкционных поверхностей, а также предотвращения возникновения очагов размножения сообществ микроорганизмов на поверхности различного оборудования, возникновения опасности распространения спор и клеток микроорганизмов в атмосфере станции в результате использования пленочных дезинфектантов на основе полимерных материалов.

Материалы и методы

Сформированы и исследованы биополимерные пленки из безопасных материалов, – карбоксиметилцеллюлозы и сукцинатхитозана. В структуру пленок включали наночастицы серебра. В качестве подложки для пленки использовали материал из фторопласта, допущенный к использованию на МКС.

© Алехова Т. А., Загустина Н. А., Новожилова Т. Ю., Александрова А. В., Башаров А. А., Плотников А. Д., 2021

* Результаты получены авторами при выполнении Целевой Работы (ЦР) «Биополимер», которая в настоящее время проводится на МКС.

Результаты

При выполнении ЦР были проведены следующие исследования:

- идентификация микроорганизмов-деструкторов, выделенных с конструкционных поверхностей ОС с целью их дальнейшего использования в созданных экспериментальных моделях – новых биополимерных системах;
- отбор штаммов микроорганизмов, подвергшихся длительному воздействию факторов космического полета, для изучения их биодеструктивной активности по отношению к новым полимерным материалам;
- синтез экспериментальных образцов биополимерных материалов;
- характеристика физико-химических свойств создаваемых биополимеров под воздействием микроорганизмов-деструкторов;
- оценка физико-химических свойств биополимеров, с целью прогнозирования надежности их эксплуатации на борту ОС.
- оценка изменения свойств новых материалов (биополимеров) при длительной их эксплуатации на РС МКС.

Показано, что пленки, сформированные на основе сукцинатахитозана с наночастицами серебра, имеют фунгицидное действие в отношении испытанных грибов и бактериостатическое действие в отношении испытанных бактерий.

Исследование защиты поверхностей различных конструкционных материалов будет способствовать повышению надежности эксплуатации оборудования, уровня безопасности условий труда и жизни персонала в гермозамкнутых объемах ОС.

Реализация программы ЦР позволит создать высокоэффективные средства купирования биокоррозионных поражений на поверхностях конструкционных материалов, применяемых в авиакосмической технике, с возможностью безопасного их применения в гермозамкнутых обитаемых космических летательных аппаратах.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

РАЗДЕЛ 2. ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИТЫ



Prof. Kuruvilla Joseph

*Indian Institute of Space Science and
Technology (IIST), Department of Space,
Thiruvananthapuram, Kerala, India*

E-mail: kuruvilla@iist.ac.in

Prof. Kuruvilla Joseph is a well-known scientist in the field of Nanomaterials, Polymer and Composites among national as well as international scientific communities. He has 3 patents and more than 180 publications in international journals. Prof. Kuruvilla has produced 19 Ph. Ds and many Master Projects. His research areas include Nanomaterials and Nanocomposites, Polymer Blends and Composites, Synthesis of Polymers from Natural Resources, Green Materials and Bio-composites, Ageing and degradation, and development of Biosensors. Process. Recently he was admitted as a fellow of the Royal Society of Chemistry.

A BRIEF REVIEW ON ELECTROSPUN LIGNIN NANOFIBERS

Prof. Kuruvilla Joseph

Keywords: Electrospinning, lignin nanofibers, carbon nanofibers, kraft lignin, organosolv lignin, alkali lignin.

The utilization of bio-based materials in various applications is currently gaining momentum and lignin occupies a valuable place among such materials. Lignins are the aromatic polymers that occur mainly in secondarily thickened plant cell walls. It occupies the second place after cellulose in its occurrence on earth. It accounts for approximately 30% of the organic carbon existing in the biosphere and is the main bio renewable source of aromatic structures. It constitutes the major constituent of plant that is responsible for the inhibition of the diffusion process of enzymes into wood and the process in turn creates strong cell walls in plants. The highly branched nature of lignin makes its structure more complex and amorphous. It consists of three phenylpropane monomers, coniferyl, sinapyl, and p-coumaryl alcohols and are termed as lignols. Each monolignol generate guaiacyl, syringyl and p-hydroxyphenyl residues respectively in the lignin polymer. The composition and ratio of lignols in the structure of lignin is profoundly influenced by the nature of the plant as well as the environment in which the plant dwells. Lignin is mainly classified

as kraft lignin, Lignin sulfonates, Organosolv lignin and Steam-exploded lignin based on their preparation methods. In accordance with the go- green motto, the researchers are keenly interested in replacing synthetic materials bio-based materials like cellulose, lignin, tannin etc. Nanofibers have great applications in many fields as filter medium, protective clothes, drug delivering agents, scaffolds, supercapacitors, catalysis, solar cell etc. because of its high porosity and surface area, of which electrospun lignin nanofibers have a specific attentiveness due to its bio-compatibility, bio-degradability and magnificent selectivity. The influential attributes of spinning solution which control the nature of electrospun fibers are its viscosity, electrical conductivity and surface tension. Instead of fibre formation, bead formation will occur when the viscosity values are higher or lower than the required value. By electrospinning suitable spinning solution with required properties, promising electrospun nanofibers can be produced and the fabricated lignin nanofibers are then stabilized thermally and carbonized.

Integrating lignin with synthetic plastics can be considered as an innovative approach in the development of sustainable polymers. However, blending lignin with other polymers is not an easy process because of its brittleness and inability to form good dispersion in many composites. Grafting lignin with poly(methyl methacrylate) via atom transfer radical polymerization would help in increasing the miscibility of lignin. The outstanding features of the electrode are credited to the exceptionally high surface area and small resistance in charge transfer of the CNF mats made out of lignin. All these works elucidate the applications of electrospun lignin nanofibers in various fields. Often discarded as an unwanted component, this promising material has vast potential of being used in various prospective applications. With the advent of electrospinning, lignin-based nanofibers find use in various biomedical as well as electronic applications. The antimicrobial properties of these nanofibers could be exploited effectively in the current pandemic situation. Present review focus on the properties and applications of lignin-based nanofibers. It also describes the various lignin derived carbon nanofibers using electrospinning.

A lot of reviews are currently published on lignin and lignin-based materials. Most of them focus on the applications of lignin and hence the idea of the present review is to concentrate entirely on lignin based nanofibers prepared by the electrospinning process and consolidate the applications of these electrospun lignin nanofibers.

NANOFORMULATED PROANTHOCYANIDINS AS AN EFFECTIVE WOUND HEALING COMPONENT

**R. Rajakumari^{1,2}, O. S. Oluwafemi², S. Rajeshkumar^{3,4},
Sabu Thomas^{1,6}, N. Kalarikkal⁷**

¹*International and Inter-University Centre for Nanoscience and Nanotechnology, Mahatma Gandhi University, Kerala 686560, India*

²*Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Av., Krasnoyarsk 660041, Russia*

³*Department of Applied Chemistry, University of Johannesburg, South Africa*

⁴*Centre for Nanomaterials Sciences Research, University of Johannesburg, South Africa*

⁵*Department of Pharmacology, Saveetha Dental College and Hospitals, Saveetha Institute of Medical and Technical Sciences (SIMATS), Chennai 600077, Tamilnadu, India*

⁶*School of Chemical Sciences, Mahatma Gandhi University, Kerala 686560, India*

⁷*School of Pure and Applied Physics, Mahatma Gandhi University, Kerala 686560, India*

There are various topical and systemic agents used for the cure of wound and antimicrobial agents which are effective in preventing infections in surgical and traumatic wounds. However, these topical agents delays re-epithelialization and might pose a risk of oversensitivity and resistance. For this reason, some alternative wound treatment methods have been investigated. Among these, the applications of plant based nanotechnology plays a significant role in the process of wound healing. The plant based materials have proved at all times to be a powerful remedy for health care. Proanthocyanidins (PCs), a component of grape seed extract (GSE), have recently being used for the treatment of wounds. However, poor absorption, poor stability and rapid elimination from the systemic circulation limit its acceptance.

Objective of the study: construction of microparticles exposed by grape seed extract and study of the wound healing effect.

Materials and methods

Grape seed extract (GSE) used in this study was purchased from JF naturals, China. Polyethylene glycol-polyvinyl acetate-polyvinyl caprolactam (Soluplus (SOLU)) were received from BASF Corporation, Mumbai. The obtained microparticles have been comprehensively investigated, including their structure, biological and early healing activity

Results

The PCs/SOLU nanodispersion formulations were characterized by XRD analysis, UV–Vis analysis, FT-IR analysis, particle size, loading efficiency and TEM analysis (Fig. 1).

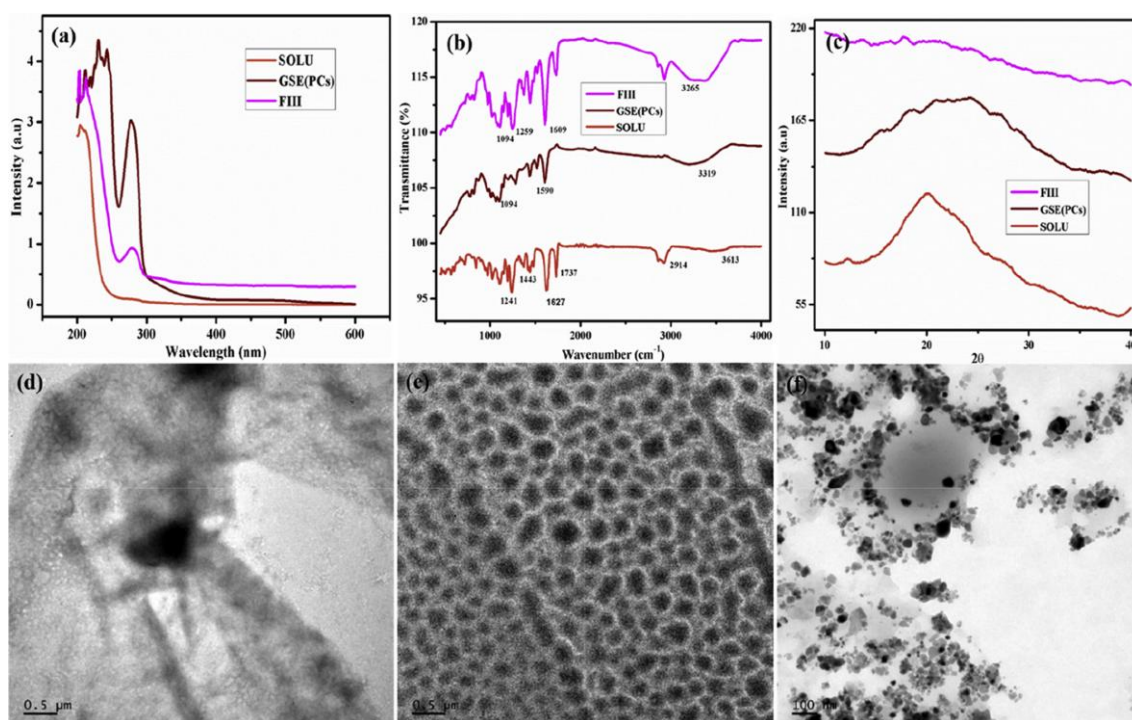


Fig. 1. UV-visible spectra (a), FTIR spectra (b) and XRD pattern of SOLU (c), PCs and FIII formulation and TEM image of (d) Soluplus (SOLU) (0,5 μm), (e) Grape seed extract (PCs) (0,5 μm) and (f) PCs/SOLU (100 nm) used for the study

PCs exhibited a peak around 270 to 280 nm (Fig. 1 (a)) which represents the π - π^* transition caused by the presence of double bond (unsaturation). This is due to the π - π interactions coming from keto part of SOLU and double bond from the PCs. In the FT-IR spectra, the position of the carbonyl peak in the FIII formulation shifted to 1738 cm⁻¹ and this shifting leads to polar-polar interactions. The FIII formulation also shows a peak broadening from 3619 cm⁻¹ to 3265 cm⁻¹ which indicates the formation of intermolecular hydrogen bonding between PCs and SOLU (Fig. 1 (b)). The diffraction pattern of the SOLU and PCs showed broad peaks at 20 and 22 indicating their amorphous nature. The addition of SOLU to the PCs completely eliminates the broad peak indicating hydrogen bonding and π - π interactions. The FIII formulation PCs/SOLU dispersion showed no characteristic peak which indicates completely amorphous nature (Fig. 1 (c)). The TEM images showed that SOLU (Fig. 1 (d)) has a flat thin sheet-like morphology while PCs (Fig. 1 (e)) appears as spherical shaped structure. It is clearly evident from the FIII formulation micrograph Fig. 1(f) that the spherically shaped particles of PCs are embedded on the surface of the polymer SOLU.

Fig. 2 displays the images of the wound site of rats with control (ointment base) (Fig. 2 (a, e, i, m & q)), GSE (PCs) (Fig. 2 (b, f, j, n & r)), Povi-Iod (Fig. 2 (c, g, k, o & s)) and PCs/SOLU ointment (Fig. 2 (d, h, l, p & t)) from the first day to 12th day of application. The PCs/SOLU treated rats show superior wound healing compared to the povidone-iodine ointment and GSE ointment treated rats. Animals were observed for 15 days without further wound coverage.

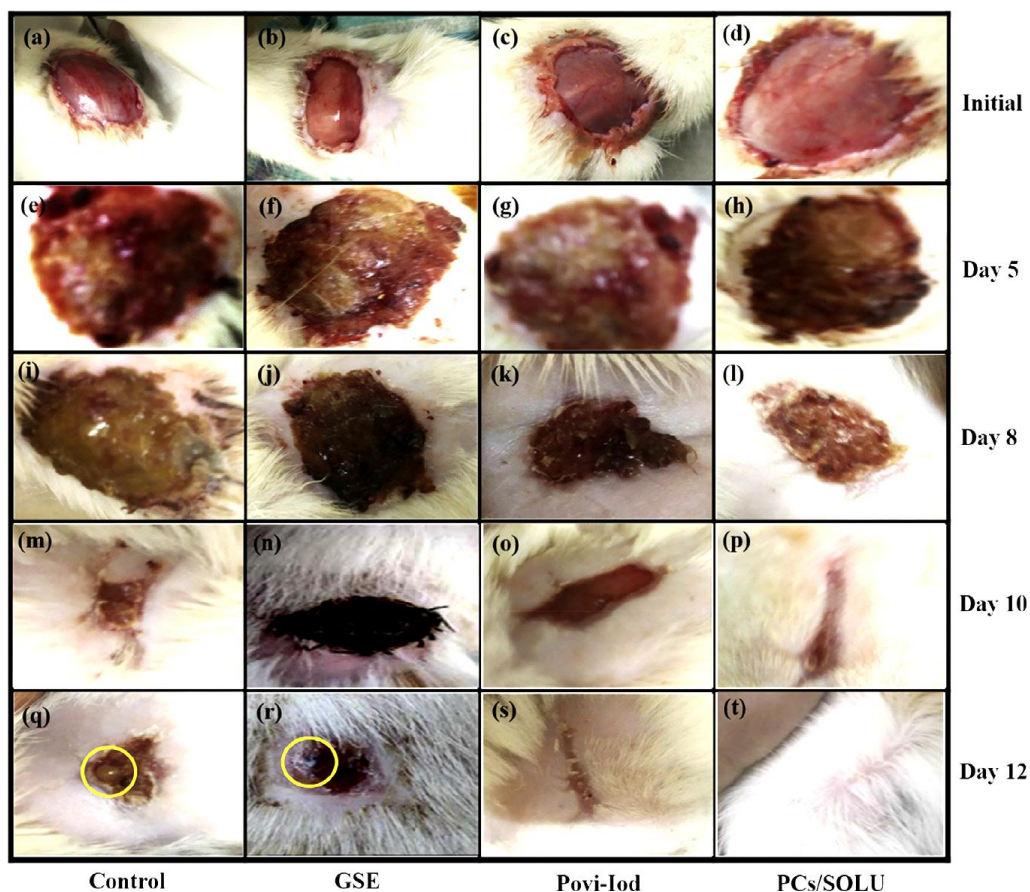


Fig. 2. Wound healing activity of the control (ointment base) (a, e, i, m and q), GSE ointment (b, f, j, n and r), povidone-iodine ointment (c, g, k, o and s) and PCs/SOLU nanodispersion ointment (d, h, l, p and t). Yellow circle indicates pus formation in the wound (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article)

On the 12th day, the PCs/SOLU ointment treated wounds were healed completely without scar formation. In the GSE (PCs) treated wounds, absence of granulation and re-epithelialization was observed on the 12th day. The animals treated with povidone-iodine ointment show scar formation which is very thick. In the case of ointment base treated animals, wound did not completely healed even after 15 days of treatment. The percentage wound contraction is higher in PCs/SOLU covered wounds and it mainly involved the centripetal movement. One important reason for the enhanced healing of the PCs/SOLU treated groups was that the polymer exhibits a high adhesion in contact with the tissues. This in turn increases the residence time and availability of PCs in the wound site for improved healing. Fig. 2 (q) and (r) shows that there was pus formation in the ointment base and GSE (PCs) ointment treated groups. This was because of the bacterial infection in the wound site which in turn delayed the wound healing in those groups. We also believed that the antibacterial activity of PCs/SOLU also contributed to the faster healing process and improved rate of epithelialization.

Thus, better wound healing ability of PCs/SOLU ointment treated group may be due to the antibacterial property (Fig. 3 (c) and (d)) and ability to increase the dissolved oxygen concentration which facilitated skin regeneration and neovascularization. The presence of PCs in the ointment might have enhanced oxygen delivery to the cells (Fig. 3 (e)). These Results further supported our assertion that PCs present in ointment aids in reducing bacterial infection at the injured area and promote faster wound healing (Fig. 3 (f)).

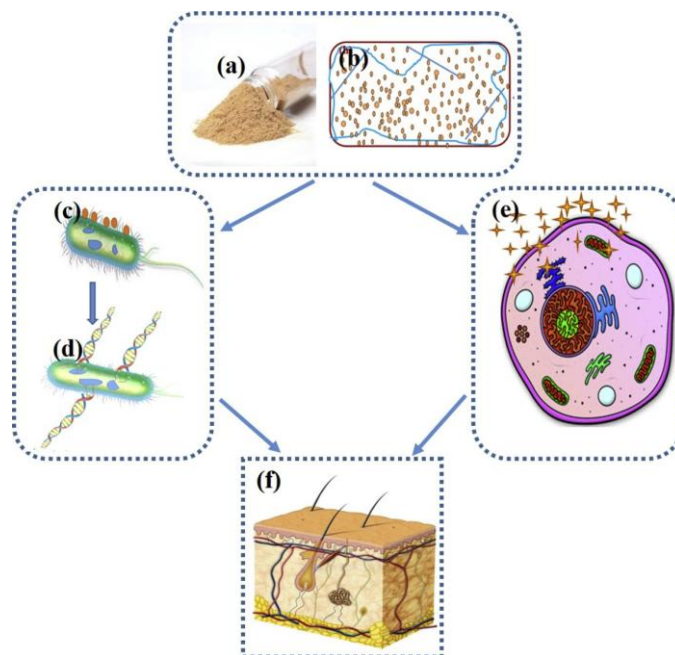


Fig. 3. Schematic diagram (a) and (b) PCs/SOLU nanodispersion (c) and (d) antibacterial activity (degradation of plasmid and genomic DNA) (e) enhanced oxygen delivery and (f) skin regeneration in wounds treated with PCs/SOLU nanodispersion

Conclusion

In this study, PCs/SOLU nanodispersion were successfully prepared and characterized. The outcomes of the current study indicate that 1 % of PCs/SOLU nanodispersion ointment of grape seed extract can accelerate excision wound healing and helps to eliminate the complications associated with the wounds such as inflammation and infections. In addition, the PCs/SOLU nanodispersion ointment can act as an antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory agent in-vivo and thus improved regeneration process in wounds.

THERMOMECHANICAL ANALYSIS OF ISORA NANOFIBRIL INCORPORATED POLYETHYLENE NANOCOMPOSITES

**Cintil Jose¹, Chin Han Chan², Tan Winie², Blessy Joseph³,
Abhimanyu Tharayil³, Hanna J Maria³, Francesco Paolo La Mantia⁴,
Didier Rouxel⁵, Marco Morreale⁶, David Laroze⁷, Lovely Mathew⁷,
Sabu Thomas³**

¹*Newman College, Thodupuzha, Kerala 685585, India*

²*Faculty of Applied Sciences, Universiti Teknologi MARA, Shah Alam 40450, Malaysia*

³*International and Inter University Centre for Nanoscience and Nanotechnology, Mahatma
Gandhi University, Kottayam, Kerala 686560, India*

⁴*Dipartimento di Ingegneria, Università di Palermo, Viale delle Scienze,
90128 Palermo, Italy*

⁵*Institut Jean Lamour, UMR 7198, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

⁶*Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Enna “Kore”, 94100 Enna, Italy*

⁷*Instituto de Alta Investigación Universidad de Tarapacá, Casilla 7D, Arica 1000000, Chile*

Cellulosic fibers offer many advantages, like easy availability, abundance, renewability, low cost, tailorable mechanical properties, reduced energy consumption with low cost, and good environmental sustainability [1]. The poor compatibility between nanocellulose and thermoplastics makes the compounding process difficult, resulting in inferior properties in the composite. In order to improve fiber–matrix interactions, various physical and chemical surface modification strategies, such as steam explosion, plasma modification, and graft polymerization, have been studied. Polyethylene (PE) is widely used in various applications and is indispensable in modern life. PE is a preferred matrix material for composites, owing to its low cost, easy availability, and good processability [2].

In the present work, plasma-modified PE containing different cellulose nanofibril concentrations were prepared by melt mixing and compression molding to obtain a polymer nanocomposite material, and studied the properties of the resulting composite.

Materials and methods

Received a composite of polyethylene (PE) reinforced with Isora Nanofibril (INF). The properties of the composite were studied using DSC, SEM, AFM, and Optical Microscopy (OM), and et al.

Results

SEM analysis performed on the neat and composite systems showed good dispersion of the cellulose fibers in the polymer matrix (Fig.1).

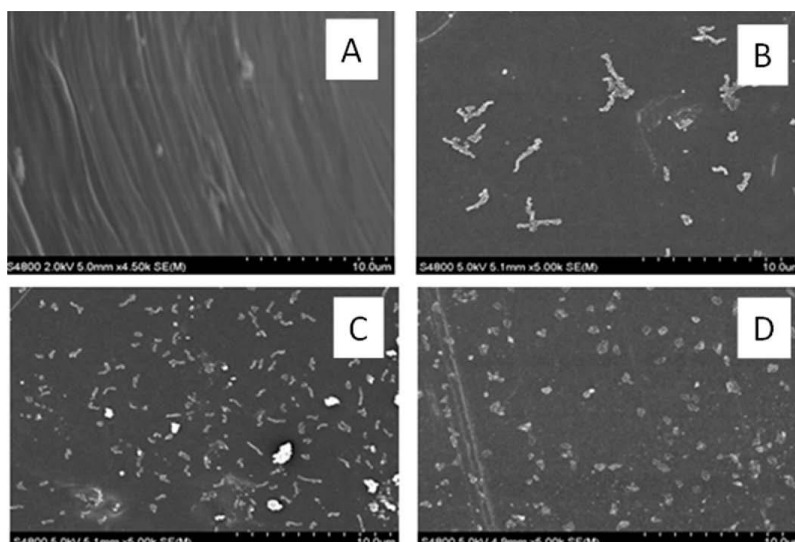


Fig. 1. Surface morphology of the composites by scanning electron microscopy (SEM) analysis for (A) neat PE, in addition to (B) 0.5 wt%, (C) 1 wt%, and (D) 3 wt% INF-reinforced PE composites

As compared with the neat PE, the composite material had a lower Eavalue. The influence of INF fibrils on the morphological, mechanical, viscoelastic, and wetting properties of PE were also studied. The morphology analysis confirmed that the dispersion of the fibers within the PE was adequate. Better interaction between the filler and the matrix was evidenced, as it led to the enhancement in properties. The entanglement between PE and isorananofibrils, known as the anchor effect, was identified as the main contributor for the PE–INF fibril force.

The AFM images of the 1 and 3 wt% PE nanocomposites are shown in Fig. 2. The nanofibrils were homogeneously dispersed, and no obvious signs of aggregation were seen.

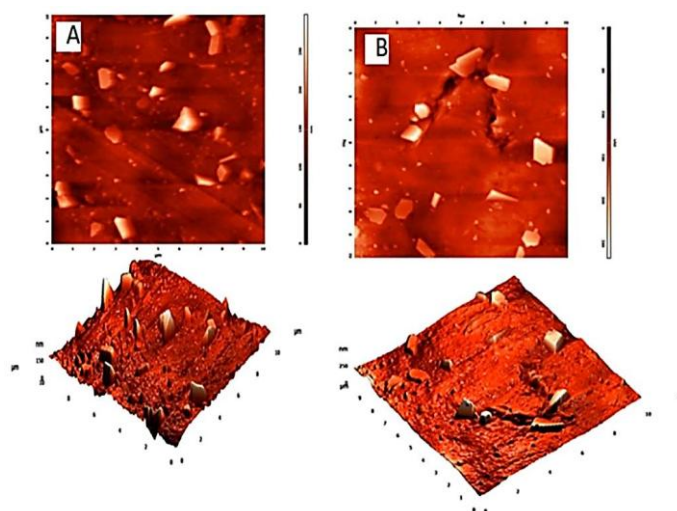


Fig. 2. Atomic force microscopy images of (A) 1 and (B) 3 wt% INF-reinforced composites (phase image and image in 3D-form)

From the stress-strain graph (Fig. 3), it can be seen that with an increase in INF loading, the Young's modulus increased, reaching a maximum at 1 wt%, and then dropped. The maximum tensile strength value was obtained for the 3 wt% INF. Similar behavior was observed for the polypropylene and PE composites containing cellulose [3]. Another reason for the improvement in mechanical properties could likely be the addition of nanofillers having high aspect ratios.

The storage modulus vs. temperature graph is given in Fig. 4. The storage modulus of the PE nanocomposites was higher than that of the neat PE.

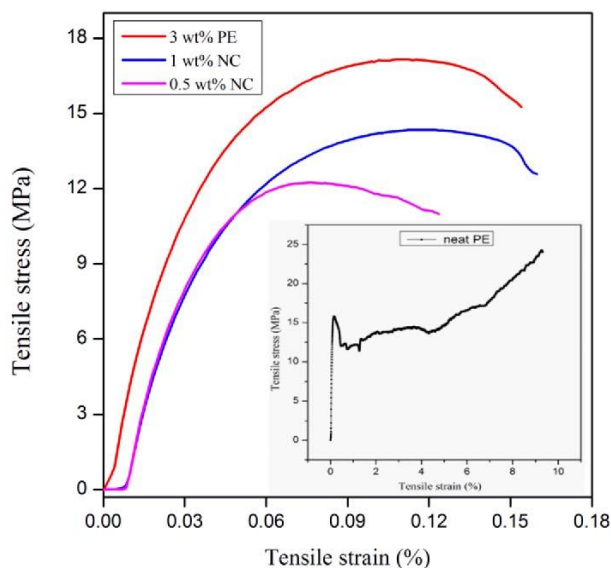


Fig. 3. Stress-strain curve of INF-PE nanocomposites at different filler loadings

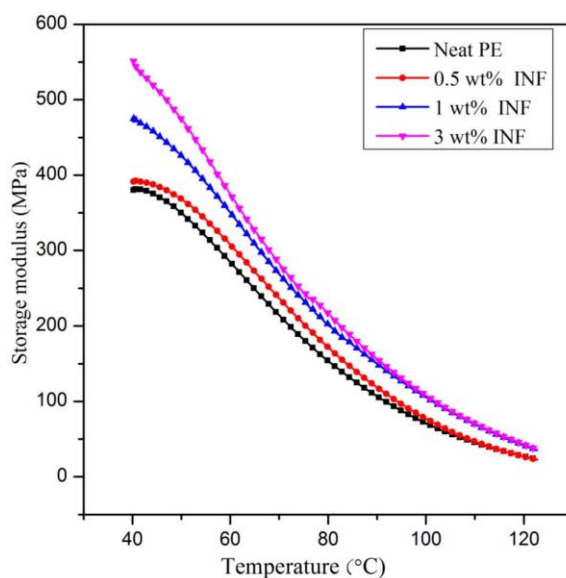


Fig. 4. Storage modulus of INF-filled PE composites

The stiffness of the PE matrix increased with the addition of the nanofiller, as a result of which the stress was better dissipated

at the interface. As the temperature was increased, the storage moduli of all the samples showed a decreasing trend due to the progressive melting of the PE.

Conclusions

In the present study, the behavior of PE composites containing nanocellulose was explained. The increase in mechanical properties was due to the uniform dispersion of fillers in the PE. The investigation on viscoelastic properties confirmed good filler-matrix interactions, facilitating the stress transfer.

References

1. Mokhena, T.C.; John, M.J. Cellulose nanomaterials: New generation materials for solving global issues. *Cellulose* 2020, 27, 1149–1194.
2. Tharayil, A.; Banerjee, S.; Kar, K.K. Dynamic mechanical properties of zinc oxide reinforced linear low density polyethylene composites. *Mater.Res. Express* 2019, 6, 055301.
3. Pothan, L.A.; Thomas, S. Effect of hybridization and chemical modification on the water-absorption behavior of banana fiber-reinforced polyester composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 91, 3865.

CASEIN STABILIZED METAL AND METAL OXIDE NANOPARTICLES FOR THE EFFICIENT *IN VITRO* CULTURING OF *SCOPARIA DULCIS* L

K. R. Rakhimol¹, Sabu Thomas¹,
Nandakumar Kalarikkal¹, K. Jayachandran²

¹*International and Inter University Centre for Nanoscience and Nanotechnology and School of Energy Materials, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, India*

²*School of Biosciences, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, India*

Unique physicochemical properties of nanoparticles make them a novel candidate in agriculture and related areas. Metal nanoparticles have their application in various fields including medicine because of their unique physicochemical properties. In agriculture, the nanoparticles are commonly used as fertilizers. Application of nanoparticles in tissue culture is very limited. *Scoparia dulcis* L is an important plant which is used as herbal medicine to treat various diseases like cancer, bronchitis, hypertension etc. Most of these biological properties are attributed by the phytochemicals present in them. Because of the high potential of *Scoparia dulcis* in traditional medicine, its large scale production through tissue culture is very much important.

In our study, we try to investigate the influence of synthesized metal and metal oxide nanoparticles (Ag, Au and CuONPs) on the callus formation in the tissue culture of *Scoparia dulcis*.

Materials and methods

Scoparia dulcis L, M S tissue culture medium, indole-3-butyric acid (IBA), butyric acid (BA), mercuric chloride, 70% ethanol, NaOH, Agar, distilled water, casein stabilized nanoparticles [silver (AgNPs), gold (AuNPs) and copper oxide CuONPs)] were used for the study. All the three nanoparticles were synthesized by casein reduction method. Casein was used as the reducing agent. 10 ml 1M NaOH was prepared and stirred well. 0.1 g of casein and 0.01 g of precursors (AgNO₃, AuCl₃, and CuSO₄) were added and continued the stirring for 5 minutes. This was then centrifuged and collected the supernatant. It was then lyophilized and suspended in distilled water. Effect of Ag, Au and CuONPs in tissue culture of *Scoparia dulcis* was determined by adding different concentrations of nanoparticles (1, 2, 4, 6, and 8 mg/l) into the tissue culture medium containing the optimum concentrations of IBA and BA for callus induction.

Results

In the present work, we have studied the effect of casein stabilized metal and metal oxide nanoparticles viz. AgNPs, AuNPs and CuONPs on in vitro propagation of *Scoparia dulcis* L. We have examined the effect of these nanoparti-

cles on the callus induction, shoot regeneration and root regeneration capacity of all the three nanoparticles.

Even though the same casein based reduction method was used for the synthesis of AgNPs, AuNPs and CuONPs, all the three nanoparticles formed were having different size and shape. AgNPs and AuNPs had a spherical shape with 13.5 and 3.5 nm diameters respectively. CuONPs were spindle shaped with 25 nm thickness (Fig.1, left). Different concentrations of auxins and cytokinins were used for the callus formation of explants. Indole-3-butyric acid (IBA) and 6-benzylaminopurin (BA) at a concentration of 4 mg/l showed a good response on callus formation which was used for all the further studies. The addition of the AgNPs in the tissue culture medium resulted in the formation of small, creamy, yellow callus formed around the explants. The callus formed was not very friable or compact. AuNPs lead the formation of brown friable callus. However, the treatment with Cu ONPs resulted in the formation of embryogenic callus which was compact and whitish green in color (Table 1 and Fig.1– right).

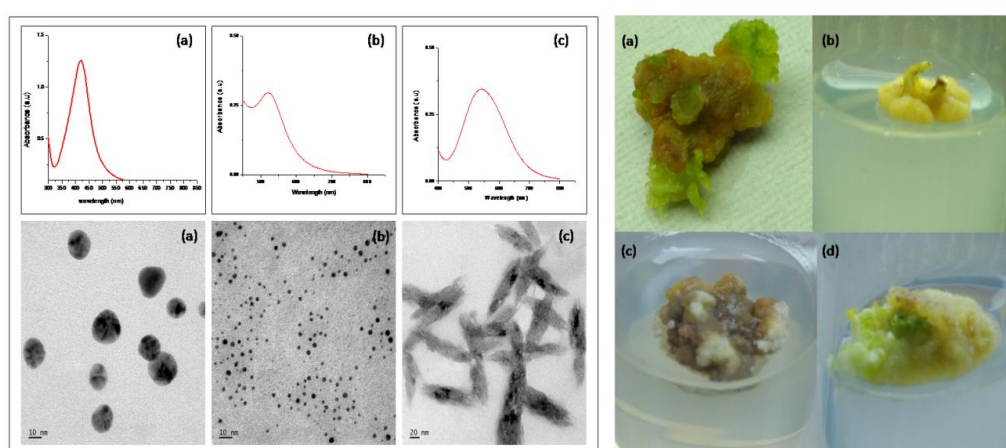


Fig. 1. UV-vis spectroscopy and TEM images of AgNPs (a), AuNPs (b) and CuONPs (c) (left); and effect of Ag, Au and CuONP on callus regeneration of *Scoparia dulcis* L. (a) callus formed in the medium with 4 mg/l IBA and 4 mg/l BA (control). (b) callus formed in the medium treated with AgNPs, (c) callus in the medium treated with AuNPs (d) callus in the medium treated with CuONPs (right)

Table 1

Difference in color, texture and nature of the callus
 after the treatment with nanoparticles

Treatment	Texture of callus	Color of callus	Nature of callus
Control (without nanoparticle)	Friable	Brownish green	Soft
AgNPs	Moderately friable	Creamy yellow	soft
AuNPs	Friable	Brown	Soft
CuONPs	Compact	Whitish green	Hard

We found that after 45 days of incubation, the callus treated with 4 mg/l CuONPs started to form micro shoots from the embryogenic callus. It was of more advantage as it did not necessitate the transfer of callus to a shooting medium for regeneration. 4 mg/l concentration of Ag, Au and CuONP showed the optimum influence on callus initiation. Callus showed a delayed and very less response to 2 mg/l concentration of nanoparticles. At this concentration of nanoparticle, the chance of contamination was higher compared to other concentrations. The contamination got reduced upon increasing the concentration of nanoparticle. However, higher concentration of nanoparticle reduced the capacity of callus regeneration. Incubation of callus in the medium containing 4mg/l of Ag, Au and CuONPs showed that the CuONPs fasten the shoot regeneration process and multiple shoots were regenerated on the callus after 45 days of incubation. Initiation of root regeneration could be observed after 50 days of incubation on the same medium. 4 mg/l AgNPs also showed regeneration of shoots after 45 days of incubation. But, only 2 or 3 shoots were regenerated and the shoots were not healthy. Root regeneration was also absent in these calluses. However, the callus treated with 4 mg/l Au NPs did not show any change even after 60 days of incubation (Fig. 2).

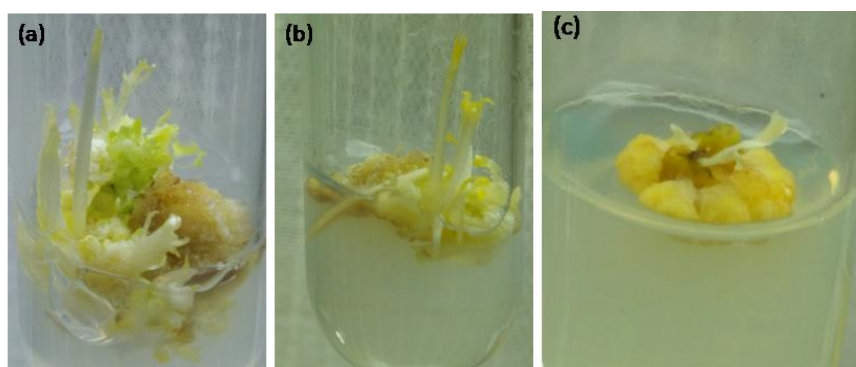


Fig. 2. Shoot and root regeneration of callus treated with nanoparticles. Multiple shoot regeneration of the callus treated with 4 mg/l CuONPs after 45 days of incubation (a), root initiation of the shoots grown in the medium containing 4 mg/l CuONPs after 50 days of incubation (b), shoot regeneration on the callus grown in medium containing 4 mg/l of AgNPs after 45 days of incubation (c)

It is observed that young leaflets formed from the calluses treated with both AgNPs and CuONPs showed a reduction in green color as compared to the untreated plantlets (Fig. 3). It might be due to the reduction in chlorophyll content of the nanoparticle treated calluses. But as the plantlet grows it became green in color. From these observations, it was understandable that the nanoparticle treatment could reduce the chlorophyll content of younger leaves only (Fig. 4).

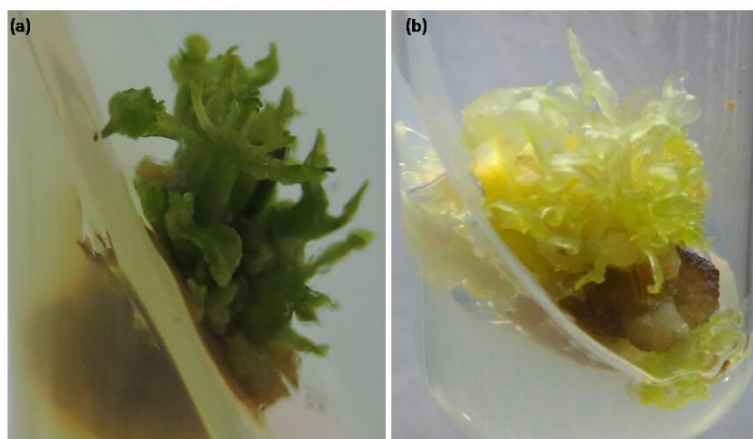


Fig. 3. Difference in the color of the shoots developed from (a) callus grown on medium without nanoparticle; callus grown on medium with CuONPs (b)

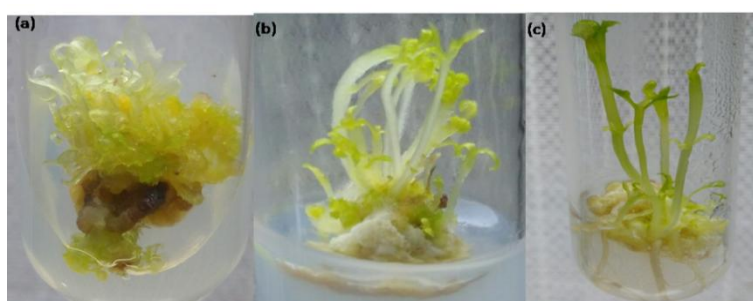


Fig. 4. Reduction in the green color of plantlets grown on medium containing CuONPs (after 40 days) (a); Regaining of green color of the leaflet as it gets older (after 45 and 50 days respectively) (b, c)

We have examined the effect of higher concentrations (8 and 10 mg/L) of synthesized nanoparticles on callus formation of explants of *Scoparia dulcis*. We found that the callus formation was low compared to 4 and 6 mg/L concentrations of nanoparticles. After 25 days of incubations, regeneration of callus was stopped and blackening of callus was occurring. It might be because of the effect of nanoparticles on cellular metabolism of the callus.

All the three nanoparticles showed a dose and time dependent effect. A concentration of 4 mg/l was observed as the optimum concentration of the nanoparticles for their maximum action. Above a particular concentration, the entire nanoparticle showed a dose and time dependent toxicity on the callus. The higher concentration of nanoparticles allowed the explants to regenerate the callus for a limited period of time and after that they inhibited the growth of callus and resulted in the blackening of the callus. Explants on the tissue culture medium without nanoparticles were prone to fungal and also to bacterial contamination to a greater extent. The treatment with all the three nanoparticles (*AgNPs*, *AuNPs* and *CuONPs*) tremendously reduced the bacterial contamination.

Conclusion

The effect of nanoparticles on in-vitro micro propagation of plants is a novel area of research. The study, it was confirmed that the metal nanoparticles could affect the size, texture and nature of callus. All the metal nanoparticles lead to the formation of calluses with different color, nature and texture of callus. Treatment of the tissue culture medium with CuONPs resulted in the formation of shoot and root regeneration in the callus inducing medium itself. The action of nanoparticles depends on the size and shape of the nanoparticle used as well as the nature of the plant.

THERMAL AND MECHANICAL STUDIES OF BIOFILLER BASED POLY-3-HYDROXYBUTYRATE BIOCOMPOSITES

Sabu Thomas^{1,2}, S. V. Baranovsky¹, E. G. Kiselev^{1,3},
A. P. Kuzmin¹, R. Pai Avinash²

¹*Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Av., Krasnoyarsk 660041, Russia*

²*International and Interuniversity Centre for Nano Science and Nano technology,
Kottayam, Kerala, India*

³*Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center
SB RAS”, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russia*

Industrial ecology and green chemistry are tools for creating new eco-friendly materials including those manufactured from renewable sources [1]. Recently, considerable research effort has focused on blending polymer materials with the available natural materials such as clay, peat, and wood flour as well as clay minerals derived from them. Montmorillonite, a layered aluminum silicate with exchangeable cations and reactive OH groups on the surface, was blended with alginate gels and films based on chitosan and graphene. This approach can not only reduce production cost, but also improve the properties (such as swelling ability, gel strength, mechanical and thermal stability) of superabsorbents [2-3]. This actualizes production and investigation of PHA-based composites filled with different natural materials.

The present study deals with producing P(3HB) biocomposites using clay, peat, and wood flour as biofillers and investigates their thermal, mechanical properties.

Experimental. Biodegradable poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] and natural materials (fillers) – clay, peat, and birch wood powder – were used to prepare powdered blends and, then, pellets and granules. Pellets were produced by cold pressing of polymer and filler powders; granules were produced from the powders wetted with ethanol. Properties of initial P(3HB) and fillers and blends thereof were studied using IR spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction patterns (X-Ray).

Results

In the present study, P(3HB) was blended with three natural materials, the blends were used to prepare pellets and granules, and their properties were studied (Fig. 1).

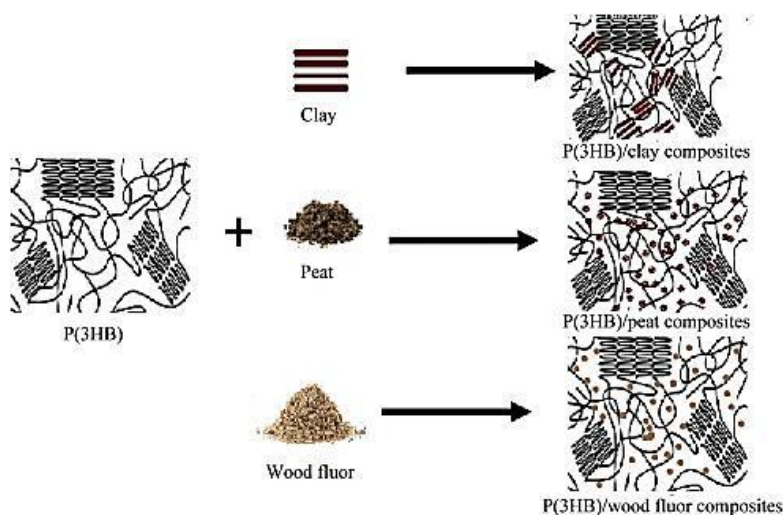


Fig. 1. The scheme for producing blends based on poly-3-hydroxybutyrate and natural fillers

IR-spectroscopy was used to reveal possible structural differences between the blends. The IR spectra of the initial P(3HB), each of the three natural materials, and their blends were taken in the $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ range [Fig. 2–3]. The spectra of all blends retained characteristic absorption bands of the initial components: for P(3HB) those were CH , CH_2 , CH_3 , $C-OH$, and $COOH$ groups; for peat – the additional and characteristic $S-S$ -, $C=C$, $C=N$, $N-H$ groups; for clay – $Si-O-Si(Al)$ and $Fe-O$ in $\alpha-Fe_2O_3$; for birch wood flour – $-C-O-$; $-C-O-C-$. No new absorption bands were visible in the spectra of the blends, suggesting that no new chemical bonds were formed and the blends prepared by the methods employed in this study, without using chemical reagents and heating, were physical mixtures.

P(3HB) is a highly crystalline material, with crystalline phase, and its degree of crystallinity (C_x) is usually above 60–65 %; the C_x of the P(3HB) sample used in this study is 75 % (Fig. 4). Diffraction peaks in $2\theta = 13.4$, 16.8 , 20 , 22.2 and 25.5° have a similar pattern when compared with previous crystallographic data for this material.

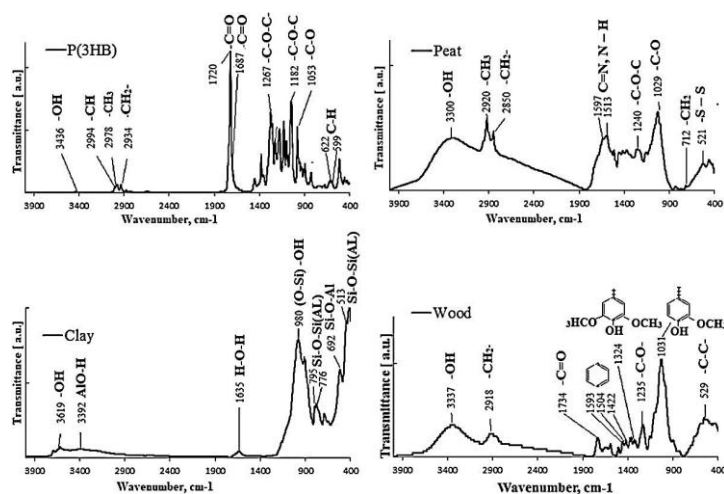


Fig. 2. FT-IR spectra of P(3HB) and natural fillers: peat, clay, and wood flour

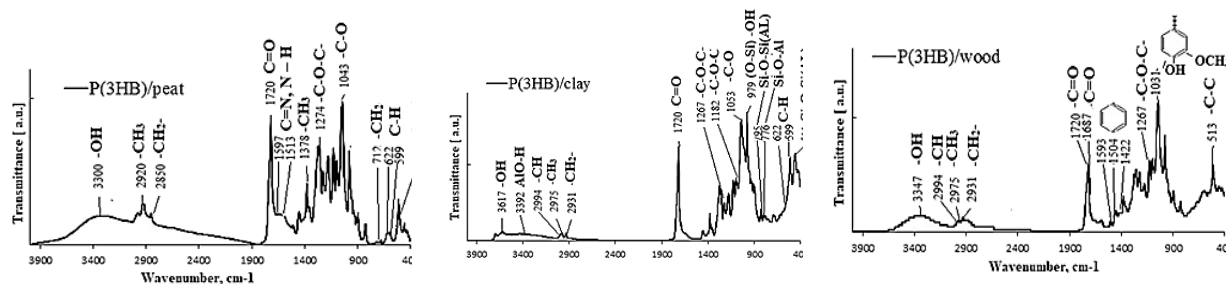


Fig. 3. FT-IR spectra of blends of P(3HB) with natural fillers: peat, clay, and wood flour

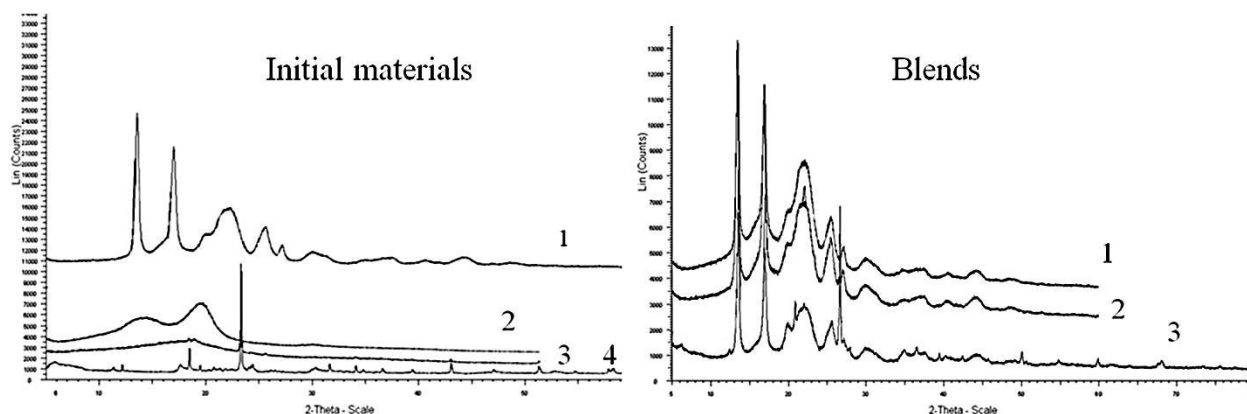


Fig. 4. X-ray diffraction patterns of the starting materials: 1 – P(3HB); 2 – wood flour; 3 – peat; 4 – clay and blends: 1 – P(3HB)/wood flour; 2 – P(3HB)/peat; 3 – P(3HB)/clay

X-ray diffraction patterns of wood flour showed distinct diffraction peaks at $2\theta = 14.2, 19.6,$ and 25.5° while X-ray examination of clay revealed numerous narrow diffraction peaks with the most distinct one was at 23.5° . Clay had the highest C_x (53 %) while in peat, amorphous phase prevailed, and their degrees of crystallinity were low (9 %). Composites [PHB:Filler = 70:30] became amorphous as the percentage of the fillers was increased (10, 30, and 50 %). The degree of crystallinity of P(3HB) was decreased more noticeably in the composites with peat and wood flour (materials with low C_x). The C_x of the P(3HB)/peat and P(3HB)/wood flour composites with 30 % filler decreased to 47 and 48 %, respectively; the C_x of the composites with 50 % of the same fillers decreased to 42 and 44 %, respectively.

P(3HB) is a thermoplastic material, with a considerable difference between melting point (176°C) and thermal decomposition temperature (287°C). Its peak of thermal decomposition is in at 297°C and the onset of the process is at 280°C . Crystallization temperature of P(3HB) is around 108°C and melting enthalpy is 89.3 J/g . Initial heating of fillers and the composites gives a small peak at a temperature between 70 and 130°C , which is associated with evaporation of moisture and volatile organic compounds. For clay, at a temperature between 60 and 200°C , moisture evaporates and starts the decomposition and evaporation of volatile organic compounds. Results showed that the fillers did not significantly affect the temperatures of melting and thermal

decomposition of P(3HB) but considerably decreased enthalpy of melting (Fig. 5).

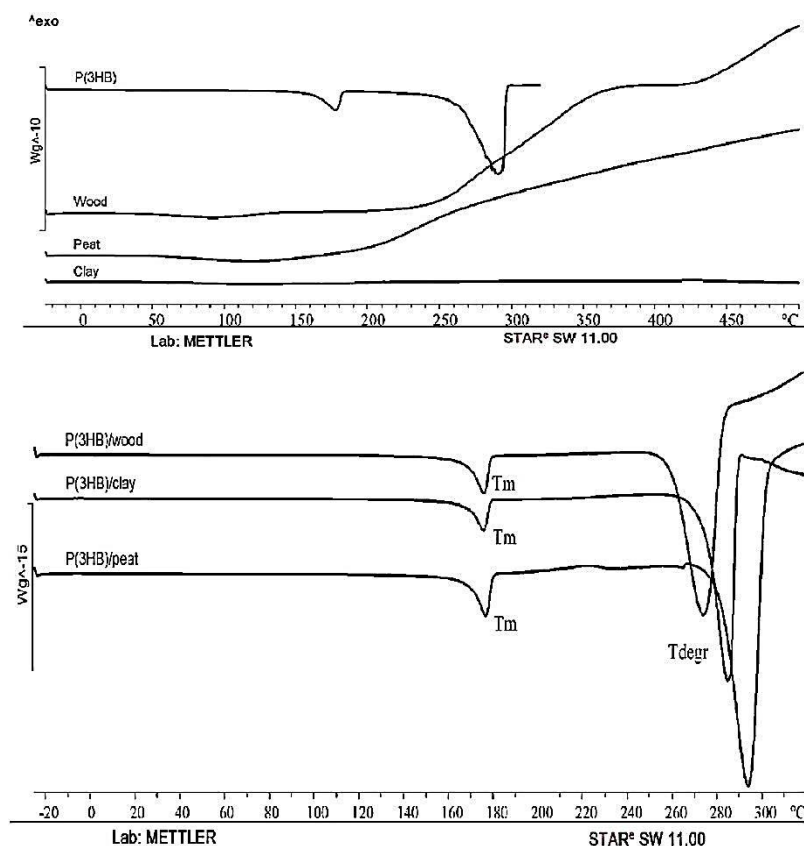


Fig. 5. Results of differential scanning calorimetry of the starting materials: P(3HB); wood flour; peat; clay and blends: P(3HB)/wood flour; P(3HB)/peat; P(3HB)/clay)

Compared to enthalpy of melting of P(3HB) (89.3 J/g), the enthalpy of melting of the composites containing 30 % clay, peat, and wood flour decreased to 38.5, 59.7, and 51.3 J/g and to 29.8, 48.7, and 45.4 °C for the composites with 50% of the fillers. Melting temperature was not affected by fillers, as it is largely the property of the polymer matrix. As the components of the composites (polymer and filler) are mixed mechanically, the chemical structure of the polymer remains unchanged, and, thus, the filler does not produce any effect on the melting temperature. The peak of degradation for the P(3HB)/clay and P(3HB)/peat composites with 30% of the filler was at 283 and 292 °C, i. e., the temperatures insignificantly different from the degradation temperature of pure polymer (287 °C); for the composites containing 50 % of the fillers, the peaks of degradation were at 276 and 290 °C, respectively. The lower degradation temperature of the composites containing 50% clay can be explained using dispersion concept. The increase in the amount of clay in the blend impaired the dispersion of the filler in the polymer matrix and clay particles could agglomerate. This secondary structure in the polymer matrix could accumulate heat from external sources and, eventually, trigger a more rapid onset of decomposition.

Conclusion

Biodegradable poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] and natural fillers – clay, peat, and birch wood flour – were used to prepare powdered composites to form pellets and granules. Pellets were produced by cold pressing of polymer and filler powder whereas granules were produced from the powders wetted with ethanol. Characterization techniques like IR spectroscopy, differential scanning calorimetry, X-ray analysis, mechanical analysis and electron microscopy were employed to study the properties of the initial P(3HB) and fillers and the composites. Analysis of the IR spectra of the composites showed the absence of chemical bonds between the components, i.e. the composites were physical mixtures.

References

1. A. Qaiss, R. Bouhf, H. Essabir, Characterization and use of coir, almond, apricot, argan, shell, and wood as reinforcement in the polymeric matrix in order to valorize these products. In: K. Hakeem, M. Jawaid, Y. Alothman O. (eds), *Agricultural Biomass Based Potential Materials*, Springer, Cham, 2015, p. 305-339.
2. M. Yadav, K. Yop, Superabsorbent nanocomposite (alginate-g-PAMPS/MMT): synthesis, characterization and swelling behavior, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 165–173.
3. M. Yadav, S. Ahmad, Montmorillonite/graphene oxide/chitosan composite: synthesis, characterization and properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 923–933.

CELLULOSE-BASED BIOMIMETIC SUPERHYDROPHOBIC SURFACES: OVERVIEW

C. S. Aghamirzeyeva, S. S. Mashayeva, N. A. Mamedova

*Institute of Polymer Materials of Azerbaijan National Academy of Sciences,
S. Vurgun str., 124,
Az 5004, Sumgait, Azerbaijan
E-mail: sevil.mashayeva@gmail.com*

Superhydrophobic surfaces are particularly interesting due to the great variety of potential application such as self-cleaning, the packaging industry, coating industry, medical device, and microfluidic device. The construction of surfaces with special wettability is inspired by wide variety biological creatures and plants, such as lotus leaf, water strider, geckos, butterfly wings, shark skin, and fish scale [1]. Inspired from nature, which reveals excellent superhydrophobicity, researchers have recently developed and implemented biomimetic superhydrophobic surfaces in a variety of smart and simple ways.

Superhydrophobic surfaces create a contact angle of water that is larger than 150° and water droplet can roll off the surface easily when the surface is tilted up slightly. One of the excellent examples of superhydrophobic surface in nature is the lotus leaf. In fact, this lotus leaf consists of micro- and nano-scale papillae that are coated on a hydrophobic wax. Such a micro-nanostructured surface can influence the movement of the water droplet [2]. This result from the natural superhydrophobic surfaces found out a way for constructing the artificial hydrophobic and superhydrophobic surfaces similar to the surface of the lotus leaves. Superhydrophobic surfaces are particularly interesting due to the great variety of potential application such as self-cleaning, the packaging industry, coating industry, medical device, and microfluidic device. A number of chemical surfaces treatments have been investigated such as the silylation or fluorination of both synthetic polymers and inorganic compounds, respectively [3].

Generally, both the surface chemistry and the surface roughness affect hydrophobicity and the interplay between these properties have been the subject of active research during the last decades. Techniques to endow the surface with nanoscale roughness, such as etching and lithography, sol-gel processing and electrospinning have been implemented while the surface chemistry has been modified by using strategies involving physical and chemical adsorption. A distinctive feature is the fact that substrates based on non-renewable materials, including minerals and synthetic polymers, are being substituted as platforms to develop superhydrophobic surfaces. However, efforts to induce hydrophobicity in bio-based materials, including cellulose, are growing.

Cellulose is an abundant, inexpensive, biodegradable and renewable biopolymer in nature which contains very good mechanical properties. There are different techniques for modifying cellulose into hydrophobic derivatives like etherification, fluorination, silylation, or grafting by using polymers. Obviously, hydrophobic properties of products depend on the initial material chemical properties. Usually from these methods the modified cellulose derivatives are not so hydrophobic and they still absorb water. Etherification of cellulose with long chain fatty acid esters helps to introduce more hydrophobic properties of modified cellulose.

Cellulose is obtained mainly from four resources; forestry, agricultural crops, industrial and animal residues. The extracted biomass that is obtained from all those sources contains three major components: cellulose, lignin and hemicellulose with percentages ranging from 40 % to 50 %, 18 % to 35 %, and 25% to 35%, respectively. The percentages of the components strongly depend on the employed source. Thus, the extracted biomass has to be processed in order to separate the different components and isolate the cellulose. There are three majors industrially employed processing or pulping technologies called sulfite, organosolv and Kraft processes [4]. Although the Kraft process is the most widely used pulping method, there are fatal drawbacks related to the use of this process such as the degradation of lignin and hemicellulose, the utilization of high temperature and pH, the release of organic sulfur compounds or the water contamination. On account of these, the major challenge is the separation and purification of the biomass without destroying the lignin and hemicellulose using more benign strategies that do not include the use of toxic and non-recyclable chemicals. Due to the drawbacks associated with the current methodologies used to dissolve and process cellulose, environmentally friendly and more efficient solvents are required. In the last decade, ionic liquids have emerged as effective and green solvents, mainly due to their high thermal and chemical stability, nonflammable nature and miscibility with many other solvent systems. In the early 2000s Swatloski et al. [5] discovered the ability of some ionic liquids to dissolve cellulose, which afterwards provoked a high interest in this area. Since the first report showing the power of ionic liquids to dissolve cellulose, many ionic liquids have been investigated either to dissolve or to create an appropriate media for the functionalization of cellulose.

Use of ionic liquids in new cellulose processing and materials technologies is a topic of burgeoning interest. The use of ionic liquids for cellulose dissolution stems from the unique properties of ionic liquids to interact with the strong hydrogen bonds of polysaccharides. The scientific discovery of the dissolution of cellulose in ionic liquids is being translated into new processing technologies, cellulose functionalization methods and new cellulose materials including blends, composites, fibers and ion gels. These materials can replace current analogs to overcome the environmental issues associated with petroleum-based products. Although there are many ionic liquids available that

can dissolve cellulose, the processing difficulties such as fractionation need to be overcome to support large-scale use.

However, due to the chemical versatility of both cellulose and ionic liquids new developments leading to the next generation of cellulosic materials are expected in the near future.

References

1. Zheng Y. M., Bai H., Huang Z. B., Tian X. L., Nie F. Q., Zhao Y., Zhai J., Jiang L. Directional water collection on wetted spider silk. *Nature* 2010, 463, 640–643.
2. Deng X., Mammen L., Butt H.-J. & Vollmer D. Candle soot as a template for a transparent robust superamphiphobic coating. *Science* 335, 67–70 (2012).
3. Song J. & Rojas O. J. Approaching superhydrophobicity from cellulosic materials : A Review. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 28, 216–238 (2013).
4. Hutchins F. E. Toxicity of Pulp and Paper Mill Effluent: A Literature Review; United States Environmental Protection Agency: Corvallis, OR, USA, 1979.
5. Swatloski R.P., Spina, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D. Dissolution Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4974–4975.

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОНИЗИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРСОДЕРЖАЩЕГО ОЗОНИДА НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА *

С. Липайкин¹, Е. Шишацкая^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, Свободный пр., 79

²Институт Биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр

“Красноярский научный центр СО РАН”,

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

В последнее десятилетие циклические органические пероксиды являются объектами интенсивных исследований химиков и фармакологов. Открытие природного пероксида артемизинина, обладающего противомаларийными свойствами, послужило мощным импульсом к созданию биологических активных веществ на основе подобных соединений. Установлено, что циклические пероксиды, в частности озониды, обладают противомаларийной, антипаразитарной, противоопухолевой, противовирусной фунгицидной активностями.

Для повышения селективности действия и уменьшения нежелательных побочных эффектов биологически активных соединений разрабатывают подходы для их депонирования и таргетной доставки. В качестве матрицы в подобных системах могут применяться полигидроксиалканоаты (ПГА) – бактериальные полиэферы с контролируемым биоразложением во всех типах биологических сред. ПГА – это полукристаллические полиэферы, нерастворимые в воде, пригодные для применения в медицине, сельском хозяйстве и промышленности.

Цель работы – получение микрочастиц на основе поли-3-гидроксибутирата, содержащих озонид ($C_{17}H_{21}ClO_5$).

Материалы и методы

Микрочастицы поли-3-гидроксибутирата (П(ЗГБ)), содержащие озонид, получены эмульсионным методом (из эмульсии вода/масло) и методом распылительного высушивания на Büchi spray dryer (BUCHI Laboratory Equipment, Switzerland).

Результаты

Установлено, что средний диаметр микрочастиц, полученных эмульсионным методом, равен $0,44 \pm 0,03$ мкм ($PDI = 0,182$) (рис. 1, а), величина ζ -потенциала – $-13,8 \pm 0,3$ мВ. Средний диаметр микрочастиц, полученных методом распылительного высушивания, – $2,6 \pm 0,1$ мкм ($PDI = 0,149$) (рис. 1, б), а величина ζ -потенциала – $-39,6 \pm 0,4$ мВ.

© Липайкин С., Шишацкая Е., 2021

* Работа выполнена за счет средств мегагранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» (Соглашение № 074–02-2018-328) по Постановлению Правительства РФ № 220 от 9 апреля 20210 г. «О мерах по привлечению ведущих ученых в вузы России» VI очередь (Соглашение СФУ и Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-626).

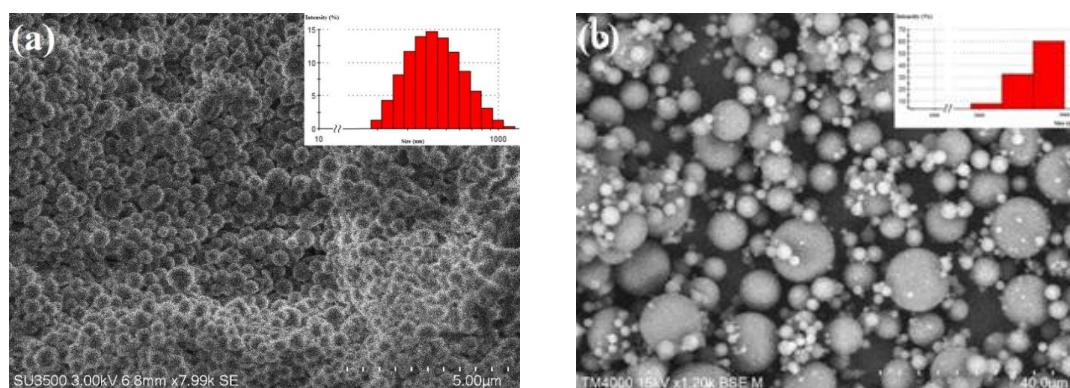


Рис. 1. SEM-снимки и размерное распределение П(ЗГБ)-микрочастиц, содержащих озонид: (а) микрочастицы, полученные эмульсионным методом; (б) микрочастицы, полученные методом распылительного высушивания

Выход активного вещества из микрочастиц в модельную среду (ДМСО) определяли спектрофотометрически на Thermo Scientific Genesys 10SUV-Vis при длине волны 268 нм (рис. 2). Определено, что полный выход препарата из П(ЗГБ)-матрикса достигается за 144 и 216 часов для частиц, полученных эмульсионным методом и методом распылительного высушивания соответственно. На основании полученных в кинетическом исследовании данных рассчитана эффективность инкапсулирования озонида и величина его включения в П(ЗГБ)-матрикс, которые составили 89,4 % и 9,7 % (эмульсионный метод) и 37,7 % и 7,1 % (метод распылительного высушивания) соответственно.

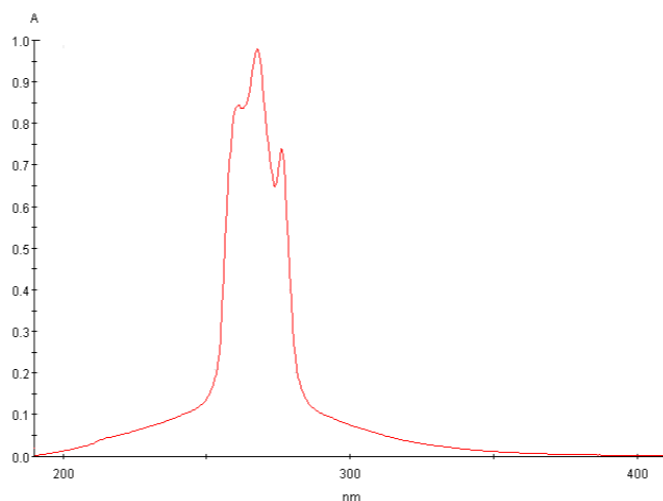


Рис. 2. Спектр поглощения озонида $C_{17}H_{21}ClO_5$

По результатам дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что включение пероксида в микрочастицы на основе П(ЗГБ) приводит к уменьшению температур плавления и кристаллизации составов по сравнению с ненагруженными частицами: 161,3 °С и 117,4 °С для микрочастиц, содержащих пероксид, по сравнению с 176 °С и 123,6 °С для ненагруженных полимерных частиц.

Заключение

В работе получены микрочастицы поли-3-гидроксибутирата, нагруженные органическим хлорсодержащим озонидом. Частицы синтезировали двумя методами: эмульсионным методом и методом распылительного высушивания. Установлено, что на размер частиц и на величину ζ -потенциала значительное влияние оказывает как метод их получения, так и наличие в частицах активного препарата. Наличие в составах озонида влияет на их термические характеристики.

Благодарности

Работы проведены с использованием аналитического оборудования, являющегося собственностью Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Образцы органических пероксидов любезно предоставлены канд. хим. наук И. А. Яременко, сотрудником Лаборатории исследования гомолитических реакций Института органической химии Н. Д. Зелинского РАН.

POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) BASED NANOPARTICLES AS A DELIVERY PLATFORM FOR CURCUMINOIDS EXTRACTED FROM CURCUMA LONGA

A. Dorokhin

Siberian Federal University, 79 Svobodnyi av., Krasnoyarsk 660041, Russian Federation

Curcumin, or diferuloylmethane, is a yellow polyphenol, extracted from the rhizome of turmeric (*Curcuma longa*). This herb contains 3–5 % of the four types of curcuminoids (CUR) [1] including curcumin (77 %), demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, and cyclocurcumin [2]. These natural compounds have been known and widely applied in traditional medicine for treating various diseases like acne, injuries, eye infections, skin diseases, stress, and depression. Researches in the recent three decades have shown the remedial effects of this molecule on different kinds of diseases including cancer, pulmonary and chronic kidney disorders, some diseases of the nervous system, cardiovascular and other diseases [3]. Also, being administered in combination with methotrexate [4] or gemcitabine [5], nanoformulations of curcumin improves the anti-tumor efficacy of these cytostatic drugs. However, poor aqueous solubility, limited bioavailability, early metabolism and rapid degradation limit the CUR performance. Drug delivery systems of CUR based on biodegradable polymeric nanoparticles can contribute to overcome these shortcomings [6].

The aim of this study was to obtain CUR delivery system based on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P3HBV) nanoparticles (CUR-P3HBV-NPs).

Material and Methods

Curcumin and related curcuminoids were extracted from *Curcuma longa* powder using ethanol as a solvent. The CUR solution was separated via centrifugation and filtered in order to remove the residual turmeric particles.

The single emulsion solvent evaporation technique was employed to produce CUR-loaded P3HBV-NPs. Briefly, P3HBV (hydroxyvalerate content is 10%, synthesized using the *Cupriavidus necator* B-10646 strain) was dissolved in CHCl_3 (1 mg/mL), followed by the addition of the CUR extract aliquot. The obtained organic phase was added dropwise to aqueous solution of PVA (0,5 mg/mL) and vigorously stirred for 5 min on SilentCrusher M (Heidolph, Germany). The resulted emulsion was magnetically stirred for 24 h until the complete CHCl_3 evaporation. CUR-P3HBV-NPs were collected via centrifugation, washed with deionized water and freeze-dried.

The loading of curcuminoids into the matrix used was confirmed spectrophotometrically on Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Surface morphology of the obtained CUR-P3HBV-NPs was evaluated using scan-

ning electron microscope (SEM) TM4000Plus (Hitachi, Japan). The mean diameter and ζ -potential were determined using Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, United Kingdom).

Results

The obtained yellow-coloured nanoparticles have the mean diameter of 521 ± 18 nm and uniform size distribution with polydispersity index of 0,187 (Fig. 1). The determined ζ -potential of CUR-P3HBV-NPs was $-32,4$ mV that prevent the obtained nanoparticles from aggregation.

Curcuminoids are quite unstable compounds and may undergo oxidative degradation in aqueous solutions accompanied by bathochromic and hypsochromic shifts in the absorption spectra, as well as the appearance of new absorption peaks. Therefore, the spectrophotometric method was chosen to examine the structural integrity of curcuminoids after encapsulation and to confirm the successful loading of CUR into the matrix used.

The obtained nanoparticles were dissolved in CHCl_3 and the absorption spectrum of this solution was compared with the spectrum of curcuminoids extracted from *Curcuma longa* with the addition of P3HBV owing to the possibility of intermolecular interactions between CUR and the polymer used. The absence of peak shifts in the spectra suggests that the extracted substances didn't undergo significant degradation during the loading process (Fig. 2).

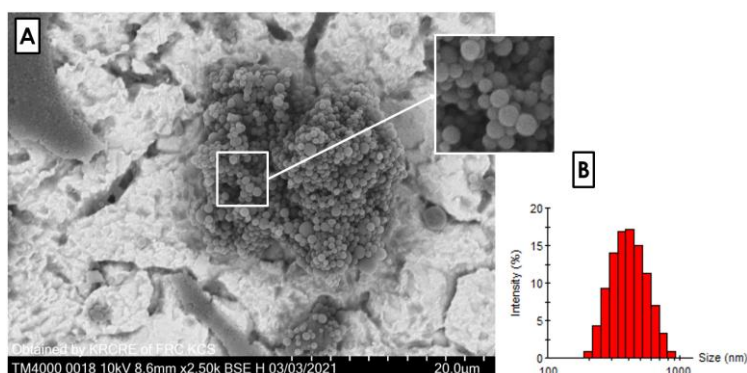


Fig. 1. (A) SEM-image of CUR-P3HBV-NPs; (B) Nanoparticles size distribution

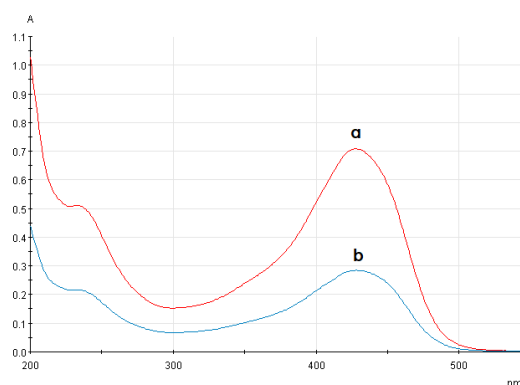


Fig. 2. CUR absorption spectrum (a); Absorption spectrum of CUR-P3HBV-NPs solution in CHCl_3 (b)

Conclusions

In this research curcuminoids nanoparticulate delivery system based on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesized by *Cupriavidus necator* B-10646 strain was obtained. CUR-containing nanoparticles have small size, narrow size distribution and high negative value of ζ -potential. The Results obtained in this work can be used in order to produce targeted P3HBV-based CUR delivery systems and platforms for cytostatic drugs delivery with the addition of natural curcuminoids.

Acknowledgments

The authors would like to express their special thanks to Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS» for providing equipment to ensure the accomplishment of this project.

References

1. Tayyem, R. F., Heath, D. D., Al-Delaimy, W. K., Rock, C. L. Curcumin Content of Turmeric and Curry Powders // Nutrition and Cancer. 2006. № 55(2). P. 126–131.
2. Heger, M., van Golen, R.F., Broekgaarden, M., Michel, M.C. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer // Pharmacological Reviews. 2014. № 66(1). P. 222–307.
3. Rafiee, Z., Nejatian, M., Daeihamed, M., Jafari, S. M. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes // Trends in Food Science & Technology. 2019. № 88. P. 445–458.
4. Vakilinezhad, M. A., Amini, A., Dara, T., Alipour, S. Methotrexate and Curcumin co-encapsulated PLGA nanoparticles as a potential breast cancer therapeutic system: In vitro and in vivo evaluation // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. № 184. URL: <https://clck.ru/NkgpP>.
5. Bisht, S., Mizuma, M., Feldmann, G., Ottenhof, N.A, Hong, S., Pramanik, D., Chenna, V., Karikari, C., Sharma, R., Goggins, M.G., Rudek, M.A., Ravi, R., Maitra, A., Maitra, A. Systemic administration of polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (NanoCurc) blocks tumor growth and metastases in preclinical models of pancreatic cancer // Molecular cancer therapeutics. 2010. № 9(8). P. 2255–2264.
6. Prabhuraj, R.S., Bomb, K., Srivastava, R., Bandyopadhyaya, R. Selection of superior targeting ligands using PEGylated PLGA nanoparticles for delivery of curcumin in the treatment of triple-negative breast cancer cells // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2020. № 57. URL: <https://clck.ru/Uch2h>.

ВЛИЯНИЕ ДЕПОНИРОВАННЫХ ФОРМ ФУНГИЦИДОВ НА ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ *

Н. В. Стрельцова, Д. А. Демьянчук

Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79
E-mail: streltsova-96@mail.ru

Картофель является важной сельскохозяйственной культурой, по объемам производства он занимает четвертое место в мире. Однако, данная культура подвержена различным грибковым заболеваниям (среди возбудителей болезней картофеля выделяют представителей родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*) и это сказывается на объемах и качестве урожая [1]. Для защиты растений применяются различные фунгициды, но они не обеспечивают 100% защиты растений, к тому же, они отрицательно влияют на окружающую среду [2]. Для повышения эффективности фунгицидов, а также для снижения объемов их использования могут быть использованы системы с контролируемым высвобождением пестицидов, депонированных в основу из природных биоразрушаемых материалов [3]. При этом депонированные формы фунгицидов должны обеспечивать эффективную защиту от фитопатогенных грибов, сдерживая их развитие в почве, и не оказывать существенного влияния на сапротрофные бактерии и грибы.

Цель работы – оценка влияния депонированных фунгицидов, применяемых для защиты картофеля от фитопатогенных грибов, на почвенный микробиом в лабораторных условиях.

Материалы и методы

Депонированные формы препаратов представляли собой гранулы следующего состава: биоразрушаемая основа/филлер/фунгицид в соотношении 60:30:10 % по весу. В качестве основы использовали биоразрушаемый полимер поли(3-гидроксибутират), филлер – березовые опилки. В работе использовали следующие фунгициды: азоксистробин, протиокназол, металоксил, дифенокназол и комбинированный препарат азоксистробина и металоксила (соотношение компонентов 60:30:5:5 %).

Эксперимент проводили в лабораторных контролируемых условиях. В пластиковые контейнеры засыпали 150 г почвы, увлажненной до 50 %. Гранулы 2-х видов (большие – 20–23 мг, малые – 16–17 мг) помещали в мешочки из органзы и инкубировали в почве в течение 16-ти недель. Оценку влияния препаратов на почвенный микробиом проводили в динамике: через 2, 4, 8, 12 и 16 недель. Оценивались такие показатели,

© Стрельцова Н. В., Демьянчук Д. А., 2021

* Работа выполнена в рамках проекта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь (Соглашение СФУ и Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-626).

как общая микробная численность (высев почвенной суспензии на МПА) и численность микромицетов (высев почвенной суспензии на сусло-агар). В отрицательном контроле фунгициды в почву не вносили. После 16-ти недельной экспозиции депонированных препаратов в почве был проанализирован видовой состав почвенных бактерий.

Результаты

Перед началом эксперимента были охарактеризованы микробная составляющая исходной почвы. Соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов было следующее: копиотрофы $(1,4 \pm 0,5) \times 10^6$, прототрофы $(4,4 \pm 0,9) \times 10^6$, олиготрофы $(4,3 \pm 0,6) \times 10^6$, азотфиксаторы $(1,7 \pm 0,2) \times 10^6$ КОЕ в 1 г почвы. Численность микромицетов составила $(14,7 \pm 1,8) \times 10^3$ КОЕ в 1 г почвы. Коэффициенты минерализации и олиготрофности составили 3,14 и 3,05, соответственно. В бактериальном сообществе доминировали виды *Bacillus muralis* и *Bacillus licheniformis*; в сообществе микромицетов – роды *Penicillium* и *Trichoderma*. Среди фитопатогенных представителей выделялись грибы рода *Alternaria* и *Fusarium*.

Оценка влияния депонированных фунгицидов на почвенные бактерии показала, что в первые 2 недели эксперимента численность бактерий при использовании гранул большого размера достоверно не отличалась от контроля, при использовании гранул меньшего размера наблюдали рост численности бактерий в 2–13,5 раз по сравнению с численностью в контрольной почве. Это может быть связано со стимулирующим действием низких концентраций фунгицидов на рост бактерий в почве. В дальнейшем связь между размером гранул и численностью бактерий в почве не обнаруживалась. Максимальную численность в контроле и опытных вариантах наблюдали через 4 недели экспозиции. Это может быть связано с постепенным разрушением гранул, активным выходом фунгицида и поступлением в почву дополнительного субстрата. Изменения численности бактерий в последующие периоды обусловлены свойствами самого активного вещества (период полураспада и растворимость в воде).

Анализ таксономического разнообразия бактериального сообщества почвы показал значительные изменения в составе почвенного микробиома по сравнению с исходной почвой. Это связано с селективным действием фунгицидных препаратов на микрофлору. При внесении некоторых видов препаратов отмечено снижение видового разнообразия бактерий. Доминировали во всех почвенных образцах представители рода *Bacillus* и актинобактерии. Кроме того, при экспозиции разных фунгицидов отмечали появление видов бактерий, не встречающихся в других вариантах, например, при внесении гранул с азоксистробином были обнаружены *Kocuria rosea*, *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas umsongensis*; с протиоконазолом и дифенокназолом – *Aeromonas schubertii*, *Clostridium cochlearium*; с мефеноксамом – *Dermacoccus nishinomiyaensis*.

Оценка влияния депонированных фунгицидов на почвенные микромицеты показала, что сильного ингибирующего действия данные формы препаратов на микромицеты не оказывали. В первые две недели их численность была либо на одном уровне с контролем, либо незначительно превышала контрольные значения. Через 4 недели экспозиции и на последующих сроках наблюдали снижение численности микромицетов по сравнению с контролем в 1,8–7 раз. Наибольший ингибирующий эффект проявляли малые гранулы с дифенокназолом, протиокназолом и комбинированным препаратом и большие гранулы с комбинированным препаратом азоксистробина и металоксила. Это указывает на активизацию биоразрушения основы гранул и выход действующего вещества в почву. Через 16 недель эксперимента численность микромицетов не превышала значения в отрицательном контроле, за исключением гранул с мефеноксамом. В образцах с депонированными фунгицидами не было обнаружено фитопатогенных представителей *Alternaria* и *Fusarium*, в отличие от исходной почвы и варианта отрицательного контроля. Доминирующим родом микромицетов во всех вариантах опыта по-прежнему был род *Trichoderma*.

Заключение

Депонированные фунгицидные препараты не оказывали ингибирующего действия на почвенные бактерии, однако проявляли селективное действие на видовой состав бактериального сообщества почвы. Действие депонированных препаратов на почвенные микромицеты было более выражено и приводило к снижению численности микромицетов в почве, а также к снижению разнообразия почвенных микромицетов, в том числе и за счет ингибирующего действия на фитопатогенных представителей *Alternaria* и *Fusarium*.

Список литературы

1. Adolf B. et al. Fungal, Oomycete, and Plasmodiophorid Diseases of Potato // The Potato Crop. – Springer, Cham, 2020. – С. 307–350.
2. Carvalho F. P. Pesticides, environment, and food safety // Food and Energy Security. – 2017. – Т. 6. – №. 2. – С. 48–60.
3. Roy A. et al. Controlled pesticide release from biodegradable polymers // Central European Journal of Chemistry. – 2014. – Т. 12. – №. 4. – С. 453–469.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

РАЗДЕЛ 3. ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ И ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ



Prof. Susana Fernandes

*University of Pau, Institute of Interdisciplinary
Research on Environment and Materials (IPREM),
Pau, France*

E-mail: 103iolum.fernandes@univ-pau.fr

Susana Fernandes is Associate Professor in Natural Polymers and Chair in Marine Biological Resources Valorization and By-products and in Marine Inspired Materials (Chair E2S UPPA – MANTA: marine materials) at the Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA), France. She is also Guest Researcher at the Ångström Laboratory, Uppsala University in Sweden. She is a chemist with expertise in research areas pertaining to functional and bio inspired biomaterials. Her research areas are focused on blue and red biotechnology, blue economy, chemical modification of biopolymers and design of functional polymeric materials from renewable resources, marine biomaterials and biomimetics etc.

She concluded her five years graduation + two years master degree in Pulp and Paper Engineering in 2006 at the University of Beira Interior, Portugal. In 2010 Susana Fernandes obtained double PhD degree (European Label) in Chemistry at the University of Aveiro (UA), Portugal and in Chemistry of Polymers at UPPA, in cooperation with the Royal Institute of Technology (KTH), Sweden. In 2010 she was awarded an International Post-doctoral Fellowship from FCT (Portuguese Science Foundation) in collaboration between the University of Aveiro, Portugal and the University of Basque Country (UPV/EHU), Spain. From 2012 to 2014 she worked as Assistant Researcher at UPV/EHU under the scope of the FP7-NMP-2011-SMALL-5 European project. In November 2014 she was awarded a Marie Curie Intra European Fellowship to develop a 2-years project at KTH, Sweden. In 2017 she worked Independent Researcher at UPPA as PI of an ANR TREMPLIN-ERC and as coordinator of a FORMAS project at Uppsala University.

Dr Fernandes has built up a track record as initiator, promotor or coordinator of various strategic research and projects. She has been able to attract funding as PI to develop her own vision and setting up her own research programs, in a total of 2.4M€ obtained in the different host laboratories from international and national bodies (Portugal, Spain, France, Sweden). She had received funding from various international agencies and awards from distinguished funding agencies which includes; Marie Curie Intra-European Fellowship (Funded by European Commission, awarded for a period of 2 years at KTH, Sweden), Future Research Leaders Grant (Funded by FORMAS – Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning, awarded for 3 years at Uppsala University, Sweden), ANR TREMPLIN-ERC 2016 Grant (Funded by the French National Research Agency, awarded for 18 months at UPPA, France), Ikerbasque Research Fellow (Basque Foundation for Science Spain, Spain), Individual Postdoctoral Grant (funded by FCT – The Portuguese Foundation for Science and Technology, awarded for 3 years for research between Portugal and Spain). In 2018 she set up a Research Chair MANTA E2S UPPA (1.5M€) in the field of Blue Biotechnology and Marin inspired Materials.

Regarding the recognition in the field, in 2019 she was invited by the Polymers Editorial Office as Guest Editor in the Special Issue on “Marine Polymeric Materials and

Biomimetics” and in 2016, by the Materials Editorial Office as Guest Editor in the Special Issue on Advances in Functionalization of Lignocellulosic Materials. Since 2019 she is Academic Editor of PLOS ONE. She has disseminated her work via over 50 articles and book chapters, 1 book, 1 patent, and over 60 conference and media appearances. Susana has an h-index of 26 and was cited more than 1700 citations (35.6 citation/article) (January 2020 web of knowledge). She received the Top Cited Authors Award for 2012-2013 from Carbohydrate Research journal.

MARINE BIO-INSPIRED MATERIALS THAT MAKE A POSITIVE CONTRIBUTION TO THE MITIGATION OF CLIMATE CHANGE AND THE SUSTAINABLE USE OF NATURAL RESOURCES

Prof. Susana Fernandes

Bioinspiration: a solution to the challenges of ecological transition?

The present communication focuses on the discovery and potential uses of marine compounds, materials and biomimetics as a response to challenges for the marine environment and human health.

Marine organisms are an extraordinary and under-exploited source of natural compounds (from molecular to macromolecular scale) with unique physicochemical, biological and structural properties. Moreover, the hierarchical structures and functionalities observed in marine organisms are a source of inspiration for the materials science community.

Despite their promise, a considerable amount of marine compounds are still scarcely exploited. Among the enormous variety of natural molecules and materials that can be extracted from marine biological resources (namely algae and animals), polysaccharides and small bioactive molecules have raised considerable interest due to their properties like biodegradability, biocompatibility, bioactivity, easy availability and low cost.

In our research group, we use blue- and red-biotechnology approaches to develop biomaterials based on: marine-origin compounds and marine biomimetics. We are establishing methodologies for the extraction of small molecules and biopolymers from marine by-products, specifically, the processing of this material to create multifunctional porous structures, films, and nanocomposite materials for potential applications in cosmetics, biomedical and nanocomposites (1, 2).

In this regard, examples of marine-based materials based on nanochitin or chitosan will be discussed, exploiting different structures or functionalities:

- chitin nanoforms to provide mechanical and topological cues to support growth of stem cells in chitosan matrices;
- chitosan 3D-scaffolds as platform for cartilage tissue engineering using stem cell spheroids cultured in hypoxia;

- mimicking the functionality of reef fish mucus to develop UV-absorbing materials.

These materials can further the cause of sustainable exploitation of natural marine resources and also reduce pollutants and emerging pollutants.

References

1. V. Zubillaga, A. M. Salaberria, T. Palomares, A. Alonso-Varona, S. Kootala, J. Labidi, S.C.M. Fernandes, *Biomacromolecules*, 2018, 19, 3000.
2. S. C. M. Fernandes, A. Alonso-Varona, T. Palomares, V. Zubillaga, J. Labidi and V. Bulone, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7, 16558.



Prof. Denis Poncelet

EncapProcess, Sucé sur Erdre, France

E-mail: denis.poncelet@encaprocess.fr

PhD in Sciences from Liège University (Belgium), he migrated to McGill University (Canada) as research associate and adjunct professor from 1986 to 1992. Back in France, he worked for Flamel Technologies, then director of the biochemistry at ENSAIA, In 1999, he moved to Oniris as professor and member of the French National Research Council. In 218, he becomes Professor.

He had developed different microencapsulation methods and especially worked the industrial transfer of encapsulation processes. He has published more than 140 articles and contributed a large number of conferences. In 1992, he cofounded the international association Bioencapsulation Research Group. He presides the association for the last 30 years and organized more than 80 conferences, industrial conventions and training schools. He created in 2006, the company Capsulae and in 2018 the consulting company EncapProcess.

MICROENCAPSULATION: A HUMAN STORY

Prof. Denis Poncelet

Introduction

Life “apparition” is generally linked to the development of the biochemistry. However, to get a living organism, the biochemistry needs to be structured as biological cells, i.e. encapsulated. Microencapsulation provides material immobilization and isolation, its protection, control of the transfer in and out of the cell, liquid-to-solid structuration and especially power to create sophisticated functions. As an example, production of ATP would not be possible without membrane and no energy would be available to the system to counteract the entropy.



Fig. 1. Prettiest microcapsule realization (<http://magicmaman.com>)

The challenge for the scientists and engineers working in encapsulation is then to mimic the biological cells. Chemical components are separated to avoid unwanted reaction, vitamins are protected from oxygen, profile of drug release is tuned-up, essential oil is converted to powder before incorporation in feed, monomers are encapsulated to develop self-healing material.

History

It exists a large panel of microencapsulation methods, combining equipment or dispersion method (Spray, dripping, extrusion, fluid bed, emulsion, ...) and a process of encapsulation (physical, chemical, ...). Each author defines the starting point of microencapsulation depending on the domain and the methods. Table 1 provides some key dates of microencapsulation development.

Applications

Microcapsules are generally not the end product but assists in developing innovative products or processes. It is then not surprising that man in the street ignores the microencapsulation.

However, microcapsules are incorporated in many of our daily products. Most of the big companies (P&G, Unilever, Nestlé, 3M, Dupont, ...) have developed products based on microcapsules. We have identified several thousand companies working on or with microcapsules. The world market count several billions of euros and is supposed to increase by 9% per year.

Far to be exhaustive, we could cite the following applications of microcapsules: drug delivery, aroma addition to food powders, artificial organs, long action of cosmetic products, agrochemical formulation, self-blocking screws, cosmeto-textiles, enzyme-loaded laundry powders, cell immobilization, liquid crystal, carbon-less paper, incorporation of additives in paint or feed.

Table 1

Some key events in microencapsulation

1932	Spray dried Arabic gum powders with sealed-in volatile was sale England
1939	Coacervation of gelatin and sodium sulfate was proposed for oil encapsulation
1953	Wurster develop the fluid bed coating process
1954	National Cash register introduced the carbonless paper using encapsulated dye.
1957	Thomas Chang at McGill University developed the concept of artificial cells
1959	The Morgans's group published series of papers describing the interfacial polymerization
1964	Liposomes were introduced in 1960 by Bangham
1970	Double-emulsion solvent evaporation was patented.
1977	Alginate beads production was the starting point of cell encapsulation
1981	Lim and Sum reported the development artificial organs.



Prof. Brigitte De Smet

EncapProcess, Sucé sur Erdre, France

E-mail: denis.poncelet@encaprocess.fr

Master in Chemistry from Liège University (Belgium) in 1980, Brigitte De Smet worked for a Belgium large manufacture as R&D engineer. After moving to Montreal (Canada), she worked as research associate on different microencapsulation projects between 1986 and 1992, publishing 8 papers in international scientific journals. Back in France, she first acted as research associate at the National School for Food Engineering at Nancy, and later, for 10 years, she was a professor of mathematics, physics and chemistry. In 2008, she created the company Impascience, and organized more than 80 scientific events, including 43 conferences, industrial conventions, workshops and training schools on microencapsulation. In 2018, she co-founded the company EncapProcess, a consulting company helping industries and research groups to develop microencapsulation projects.

ENCAPSULATION USING DRIPPING: FROM FUNDAMENTAL TO INDUSTRIAL PRODUCTION

Brigitte De Smet, Denis Poncelet

Introduction

Encapsulation using dripping technologies consists in extruding a liquid drop-by-drop from a nozzle and collecting the droplets in a solidification bath. Versatile, simple, powerful, biocompatible are some of reasons why these technologies encounter a great success. The contribution will focus on how to proceed to get homogeneous droplet size from laboratory to industrial scale.

Dripping Regime

For low flow rates, the liquid detaches from the nozzle drop by drop following the equation:

$$mg = \pi\gamma d_e \quad (1)$$

Where m is the mass of the droplet, γ the surface tension and d_e the external diameter of the nozzle. If the flow is increased, the liquid forms a jet which breaks in droplet at a specific frequency defined by:

$$\lambda = 4,5d_i \quad (2)$$

Where λ the wavelength and d_i the internal nozzle diameter. This Results in droplet of $1.9 d_i$. If the flow rate is too high, the liquid form a spray (Fig. 1).

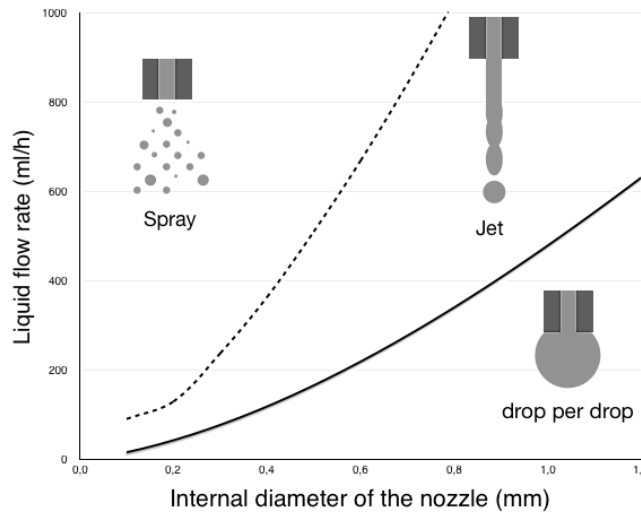


Fig. 1. Dripping regime.

Droplet Size and Productivity

Simple drop-by-drop provides droplets of 2 to 3 mm. To reduce the size, the easier solution is to applied an electrostatic potential to the needle (Fig. 2). The size may then be reduced to a few hundreds' micrometres. This is the option often applied for biomedical applications.

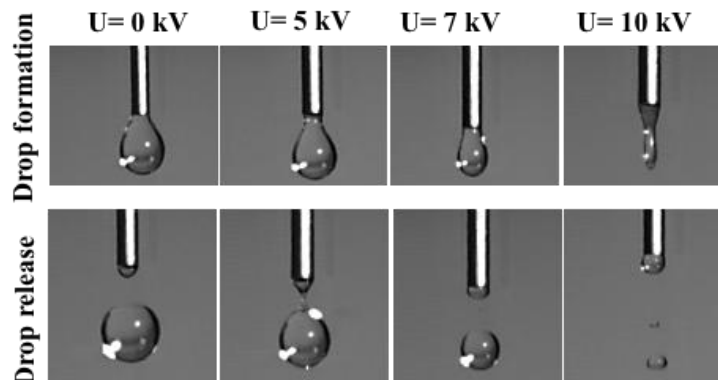


Fig. 2. Electrodripping

However, for larger production, the jet regime is preferred either applying an optimum frequency vibration (Fig. 3a) or cutting the jet with a rotating wheel (Fig. 3b).

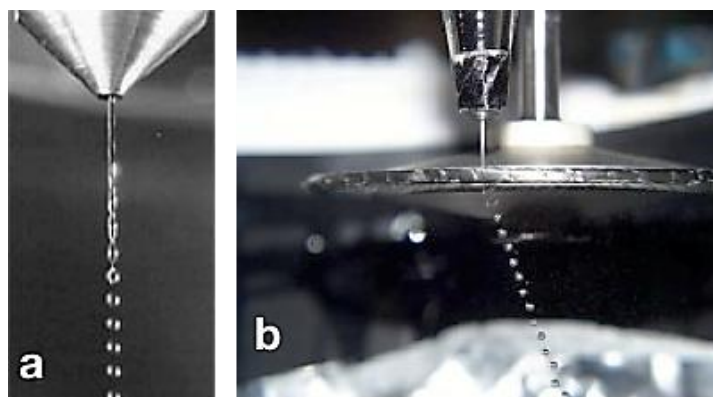


Fig. 3. Jet breaking system

For real large throughput, the system has to be developed as continuous process, allowing to make up to hundred tons per year. The solidification liquid has to be recycled; including re-equilibrating the solution based either on mass balance or sensor measurements.

Conclusions

The dripping technologies are really versatile as examples will be provided. They look simple but to really provide a high quality and controlled products, one has to respect rules which are not always known or understood correctly. The contribution will try to make a clear state-of-art of these technologies.



Prof. Vasif Hasirci

Acibadem University, Department of Medical Engineering, and ACU Biomaterials Center, 34752 Istanbul, Turkey and BIOMATEN, METU Center of Excellence in Biomaterials and Tissue Engineering, Ankara, Turkey

E-mail: vasif.hasirci@acibadem.edu.tr

Dr. Vasif Hasirci has expertise in biomedical, biotechnological and nanotechnological applications of natural and synthetic polymers. He has founded the Center of Excellence in Biomaterials and Tissue Engineering at the Middle East Technical University (METU) with his colleagues. Since 2018 he is a professor at Acibadem University, Department of Medical Engineering in Istanbul and is establishing the Biomaterials Center called ACU Biomaterials Center.

He serves on the Editorial Boards of several journals including Biomaterials and Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition. He is a Fellow of the Science Academy (Turkey), the International College of Fellows of Biomaterials Science and Engineering (FBSE), and the Royal Society of Chemistry (FRSC) (UK) and a Honorary Member of the European Society for Biomaterials (ESB). He is the founding President of the Biomaterials and Tissue Engineering Society (Turkey) and is also a member of the American Chemical Society and Turkish Chemistry Society.

BIOMATERIALS AS TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS, TISSUE MODELS AND DIAGNOSTIC DEVICES

Prof. Vasif Hasirci

Biomaterials are medical devices that have to be bio- and hemo-compatible by nature and can be obtained from polymeric, ceramic and metallic sources. Their most common uses are as implants and as drug delivery devices. In the last 25 years tissue engineering branched off from classical biomaterials as a cell carrying version. In tissue engineering, biodegradable polymeric devices are loaded with cells and sometimes with bioactive agents to serve as a substitute for the tissues that are lost or damaged. Recent applications of biomaterials and of the concept of tissue engineering are tissue models and their use diagnostic devices. In tissue models the goal is not to produce cell carrying materials as tissue substitutes but rather to mimic natural tissues to substitute for animals in *in vivo* testing. In diagnostic devices biomaterials and cells are brought together to study their interaction under conditions more controlled

than *in vivo* applications. Among the tissue models, cancer models are studied most intensely. Such studies involve optimization of the mimicking level for drug dose testing and patient-specific drug selection. In such studies the model might involve hydrogel-based materials to restrain the cancerous and healthy cells in defined locations. The more recent 3D cell culture systems use high density cell groupings like spheroids or organoids. Another development is the use of micro and nano-modified surfaces in the amplification of cell responses. Thus, the biomaterials field is in a very exciting expansion and diversification era.



Dr. Aristidis Tsatsakis

Center of Toxicology Science & Research, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

E-mail: tsatsaka@uoc.gr

Aristides Tsatsakis is the Director of the Department of Toxicology and Forensic Sciences of the Medical School at the University of Crete and the University Hospital of Heraklion and also the Chairman of the Division of Morphology of the Medical School of the University of Crete in Greece

The main research interests of Professor Tsatsakis include biomonitoring and risk assessments of xenobiotics as well as links of chronic exposure to them at low doses with health problems and diseases. He developed numerous biomarkers of exposure and of effects for various chemicals, in particular pesticides, pharmaceuticals, etc., uncovering the mechanistic understanding of the mode of action and adverse outcome pathways leading to clinical effects.

Dr Tsatsakis integrated experimental in vivo and vitro studies with epidemiological evidence especially in the field of pesticide toxicology, epidemiology and hygiene, and work out the data sets for better understanding of the associations that predetermine plausibility and credibility in order to be used efficient for regulatory directives and norms for the protection of the society and the environment in general. He penetrated with his works aspects of concerning a large variety of xenobiotics of resent interest lately concentrated in effects of endocrine disruption, carcinogenicity, reproduction and neurodegenerative disease. His articles are easily assessed in international highly impact journals.

Lately his present ambitious project is about setting a new experimental methodology which intends to provide at one strike multi-answers to multi-questions related to current concerns about mixtures of chemicals from many different sources at doses around or well below the regulatory limits, to which general population is exposed every day.

A NEW PROTOCOL FOR RISK ASSESSMENT OF LONG TERM LOW DOSES EXPOSURE TO COMPLEX MIXTURES OF PESTICIDES

Anca Oana Docea¹, Daniela Calina², Christina Tsitsimpikou³,
Monica Neagu⁴, Eliza Gofita¹, Aristidis Tsatsakis⁵

¹*Department of Toxicology, University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Craiova 200349, Romania; e-mail: daoana00@gmail.com*

²*Department of Clinical Pharmacology, University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Craiova 200349, Romania*

³*Department of Hazardous Substances, Mixtures and Articles, Directorate of Energy, Industrial & Chemical Products, General Chemical State Laboratory of Greece, Athens, Greece*

⁴*Immunology Department, "Victor Babes" National Institute of Pathology, 99–101 Splaiul Independentei, 050096 Bucharest, Romania*

⁵*Center of Toxicology Science & Research, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece; e-mail: tsatsaka@uoc.gr*

Everyday consumers of all ages are exposed via food and water to a wide range of pesticide residues. Even these substances are in very low doses for long time exposure the health effects could be surprising. Till now, risk assessment of compounds as pesticides focused on individual compounds. But in real life the consumer is exposed, however, to complex mixtures of compounds via foods and drinks and these approaches cannot assess risks in a highly relevant manner.

Aim of study

Even if the ADI is defined as the amount of a substance used as pesticide that can be ingested daily over a lifetime without appreciable risk to health, sometimes in mixture with joint, cumulative toxicity could appear. This study want to evaluate if mixtures of different classes of pesticides in doses around ADI: 0.25x ADI, 0.5xADI, ADI, 5xADI and 10xADI as could be seen in real life exposure, create any health problems after long term exposure and apply on an animal model.

Material and Method

CD-SD rats from 7 study groups (5 males and 5 females in each group) will receive mixtures of pesticides in 0, 0.25xADI, 0.5xADI, ADI, 5xADI and 10xADI doses and feed and water unrestricted for 52 weeks. All the animals will be examined every day for signs of morbidity and mortality. At every 3 months an ophthalmological examination and a series of tests for neurotoxicity will be done. At 6 and 12 months will determine from blood chemistry parameters, hormone, hematological parameters, oxidative stress markers and genotoxicity. Urinalysis will be done from urine collected after 6 and 12 months of exposure. After 12 months of exposure all the animals will be killed and a detailed necropsy will be done.

Results and conclusions

A major challenge for this study is to elucidate the mechanistic link between lifelong environmental exposure to combinations of pesticides and disease onset and translate this into cost-effective targeted policy interventions toward public health protection. If this hypothesis were shown to be true, this should induce ecologists and public authorities to reconsider the widespread sometimes (if not often) irresponsible use of pesticides and to recalculate the ADI taking into account the combined effect of different substances. Conceivably, a ban or severe limitation of different kind of pesticides might in time reduce the impact of different chronic diseases and also the costs with their treatment.

Prof. Alla B. Salmina



Chief Researcher & Head, Laboratory of Experimental Brain Cytology, Division of Brain Sciences, Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Chief Researcher, Research Institute of Molecular Medicine & Pathobiochemistry, Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: allasalmina@mail.ru

А. Б. Салмина – специалист в области патофизиологии, биохимии, молекулярной и трансляционной медицины. Сфера научных интересов: молекулярные механизмы межклеточной коммуникации в нейроваскулярной единице головного мозга, молекулярная патология центральной нервной системы, развитие головного мозга, нейропластичность, механизмы социального поведения, моделирование гематоэнцефалического барьера и нейрогенных ниш in vitro.

Основатель и руководитель научной школы «Новые технологии управления молекулярными механизмами межклеточной коммуникации для задач трансляционной медицины», неоднократно поддержанной Советом по грантам Президента РФ как ведущая научная школа РФ по направлению «медицина». Лауреат Золотой медали и Премии РАН для молодых ученых, Премии Правительства РФ в области науки и техники для молодых ученых, Международной премии Scopus Award Russia.

**MODERN MATERIALS FOR MODELING BRAIN TISSUE
AND BLOOD-BRAIN BARRIER IN VITRO ***

**Alla B. Salmina, Natalia A. Malinovskaya, Vladimir V. Salmin,
Elena D. Osipova, Andrey V. Morgun**

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky

Keywords: brain, neurogenesis, angiogenesis, in vitro blood-brain barrier model, mitochondria, brain microvessel endothelial cells, astrocytes, microglia.

Neurovascular unit (NVU) is an ensemble of brain cells (cerebral endothelial cells, astrocytes, pericytes, neurons, microglia) which regulates processes

© Salmina A. B., Malinovskaya N. A., Salmin V. V., Osipova E. D., Morgun A. V., 2021

* The work is supported by the State Assignment for research (Ministry of Public Health, Russian Federation), by the grant № IIII-2547.2020.7 given by the President of Russian Federation for Russian Leading Research Teams, and by the grant № МД-3923.2019.7 given by the President of Russian Federation for young doctors of sciences.

of transport through the blood-brain barrier (BBB), controls local microcirculation, intercellular metabolic coupling. Dysfunction on NVU contributes to numerous types of central nervous system pathology, i. e. neurodegeneration, neurodevelopmental disorders, brain ischemia, and neuroinflammation.

NVU pathophysiology has been extensively studied in various animal models of brain disorders, and there is growing evidence that modern approaches utilizing in vitro models are very prospective in the assessment of intercellular communications within the NVU. Development of neurovascular unit on a chip or BBB-on-chip as well as 3D NVU and brain tissue models suggests novel clues to understanding cell-to-cell interactions critical for brain functional activity, being therefore very important for translational studies, drug discovery, and establishment of novel analytical platforms.

One of the mechanisms that are controlled by NVU activity is neurogenesis occurring in highly specialized areas of brain (neurogenic niches, NN) that are well-equipped for the maintenance of stem/progenitor cells pool, proliferation, differentiation and migration of newly formed neuronal and glial cells. Specific properties of brain microvascular endothelial cells, particularly, high content of mitochondria, are important for establishment of vascular support in NVU and NN. Mitochondrial activity of cells within NN and NVU contributes a lot to maintaining intercellular communications critical for BBB integrity, cells development, and neuronal excitability.

We will discuss modern approaches to development of optimal microenvironment for neural stem and progenitor cells, endothelial cells grown in pro-neurogenic and pro-angiogenic conditions within BBB, NVU and NN resembling physiological brain plasticity and aberrant intercellular communications in neurodegeneration.

DEVELOPMENT OF THE BIOLUMINESCENT APTASENSORS FOR DETECTION OF BLOOD BIOMARKERS*

V. V. Krasitskaya¹, M. A. Vorobyeva², A. S. Davydova²,
 E. E. Bashmakova¹, A. G. Venyaminova², L. A. Frank¹

¹*Institute of Biophysics, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia*
²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia*
 E-mail: lfrank@yandex.ru

Bioluminescent proteins – luciferases and reporters on their base are widely applied as highly sensitive and specific analytical instruments in biotechnology, biomedicine and environment. Of special interest are coelenterazine-dependent luciferases, using coelenterazine and its derivatives as substrate [1]. Ca^{2+} -activated photoproteins are the stable complexes of apoprotein and preoxidized substrate – 2-hydroperoxycoelenterazine, which emits blue light under Ca^{2+} binding. High quantum yield and flash-type kinetics of the reaction, stability to chemical and genetic modification and under storage and practically unlimited linear dose-responds diapason, make these proteins a brilliant reporter for science and applications.

DNA (RNA) aptamers are relatively small single-chain oligonucleotides with unique spatial structures allowing them to recognize and bind the appropriate target molecules. Currently, aptamers represent the most promising alternative to monoclonal antibodies, which are traditionally used as biospecific elements in analytics. The aim of this work was to develop analytical systems based on the combination of photoprotein obelin bioluminescence and aptamers providing highly sensitive and specific detection of the blood biomarkers. Cardiomarker troponin I (cTnI), human hemoglobin (Hb), and its glycosylated form (Hb1Ac) were used as targets.

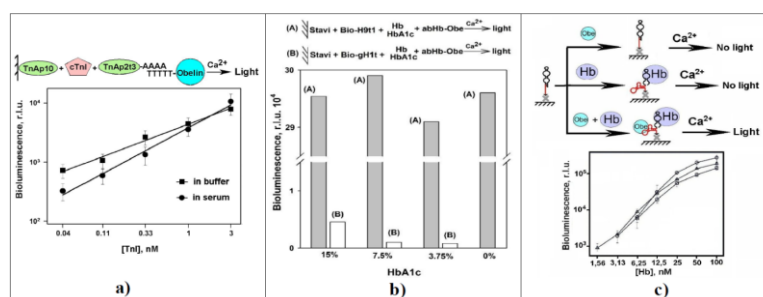


Fig. 1. Model bioluminescent aptamer-based microassay of cTnI (a); b – Model bioluminescent aptamer-based microassay of Hb and HbA1c; c – Bioluminescent detection of Hb with bi-specific aptamers Apt79t1-H9t11 (–□–), H9t11-L-Apt79t1 (–Δ–) or Apt79t1-L-H9t11 (–○–) at simultaneous addition of obelin (100 nM)

© Krasitskaya V. V., Vorobyeva M. A., Davydova A. S., Bashmakova E. E., Venyaminova A. G., Frank L. A., 2021

* The work was partially supported by the Russian Science Foundation (grant №16-14-10296).

DNA aptamers highly specific to cTnI were obtained using the SELEX technology. The assessment of DNA library enrichment, individual aptamers binding affinity, size optimization and identification of pairing aptamers were carried out using special approaches based on obelin bioluminescent signal [2]. A couple of aptamers, affine to the different troponin aptatopes – TnAp10 and TnAp2t3, were applied for cTnI detection in model samples by the solid-phase 120ioluminescent microassay (Fig. 1a)). The assay sensitivity was 0.06 Nm (72 pg) cTnI, variation coefficient of 6.8 %.

High specificity of cTnI detection was shown: there is no binding to cardiac troponins T and C, as well as their complexes, phosphorylated form of cTnI, troponin I of skeletal form.

Glycated hemoglobin is one of the main biomarkers of diabetes as its percentage reflects the mean glucose level over the past 2 months of the disease. To analyze total Hb and Hb1Ac, the 2'-F- RNA aptamers H9t1 and Gh1t, with different specificity to these hemoglobins were applied [3]. For model solid-phase analysis (Fig. 1B, top), we used solutions with a total Hb concentration of 2 Mm, containing different proportions of HbA1c (3.75, 7.5, or 15 %). The wells were activated with the aptamers, then incubated with model solutions, washed, and the resulting complexes were exhibited with the obelin-anti-Hb antibodies conjugate (Fig. 1b). The wells activated with H9t1, which binds both hemoglobins, showed practically the same bioluminescent signals, with no more than 3% differences. Whereas activations by the aptamer Gh1t, which selectively binds HbA1c, resulted in bioluminescence depending on the content of this particular hemoglobin form in the sample.

We also developed a bi-specific aptamer capable of sequentially bind the target and reporter molecules to reduce the number of assay steps. The construct of the kind includes anti-Hb and anti- obelin 2'-F-RNA aptamers, developed by us earlier [4, 5]. Within it, the Hb-binding aptamer mostly retains its structure, while the obelin-binding one is 'hidden' and unable to recognize the reporter. Bi-specific aptamer, immobilized on the surface, binds Hb inducing the structural rearrangement of the whole construct leading to restoration of the binding capacity of obelin. The resulting three- molecular complex was displayed by the obelin bioluminescence at the injection of Ca^{2+} (Fig. 1c)). No signals were observed in the absence of any proteins – the target or reporter, in the analyzing mixture. In addition to reducing the number of analysis steps, this approach allows using intact obelin with initial activity, a partial loss of which is inevitable upon chemical pre-conjugation with a biospecific molecule.

The Results of these experiments clearly demonstrate the potential of the developed aptamer-based analytical approach. In turn, photoprotein obelin as an analytical instrument represents a highly sensitive, fast, and simple reporter. The combination of these molecules has good prospects for both basic and applied studies.

References

1. V. V. Krasitskaya, E. E. Bashmakova, L. A. Frank. Coelenterazine-dependent luciferases as a powerful analytical tool for research and biomedical applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7465.
2. V. V. Krasitskaya, N. S. Goncharova, V. V. Biriukov, E. E. Bashmakova, M. R. Kabilov, I. K. Baykov, A. E. Sokolov, L. A. Frank. The Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin as a tool for SELEX monitoring and DNA aptamer affinity evaluation. *Photochem. Photobiol.* 2020, 96, 1041-1046.
3. A. Davydova, M. Vorobyeva, E. Bashmakova, P. Vorobjev, O. Krasheninina, A. Tupikin, M. Kabilov, V. Krasitskaya, L. Frank, A. Venyaminova. Development and characterization of novel 2'-F-RNA aptamers specific to human total and glycosylated hemoglobins. *Anal. Biochem.* 2019, 570, 43-50.
4. В. В. Красицкая, А. С. Давыдова, М. А. Воробьева, Л. А. Франк. Ca^{2+} -регулируемый фотопротейн обелин как мишень для отбора РНК-аптамеров. *Биоорган. Химия.* 2018, 44, 287-293.
5. A. Davydova, V. Krasitskaya, P. Vorobjev, V. Timoshenko, A. Tupikin, M. Kabilov, L. Frank, A. Venyaminova, M. Vorobyeva. Reporter-recruiting bifunctional aptasensor for bioluminescent analytical assays. *RSC Adv.* 2020, 10, 32393.

О ПЕРСПЕКТИВАХ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ОКСИДАЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ И НАНОАЛМАЗОВ В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМ ИНДИКАЦИИ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОЙ АНАЛИТИКИ

Н. О. Ронжин, О. А. Могильная, Е. Д. Посохина, В. С. Бондарь

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 660036 Красноярск,
Россия; e-mail: roniol@mail.ru*

Создание простых и эффективных средств аналитики для медицинской диагностики и экологического мониторинга является одним из актуальных научных направлений, которое развивается в последнее десятилетие во многих странах [1–5]. При конструировании таких аналитических систем в качестве селективных и эффективных биокатализаторов используют оксидоредуктазы [6]. С помощью иммобилизации этих ферментов на разных матрицах разрабатывают системы индикации и диагностики биомедицинского назначения [7–9].

Для специалистов в данной области интерес представляют ферменты высших грибов, в частности экстраклеточные ФАД-, гем- и медьсодержащие оксидоредуктазы [10–12]. Исследователи многих стран проводят скрининг для выявления среди базидиальных грибов перспективных источников известных оксидоредуктаз и новых ферментов этого класса. Оксидоредуктазы базидиомицетов применяют в качестве биокатализаторов в создании высокочувствительных и селективных тест-систем для аналитических приложений. ФАД-содержащие оксидоредуктазы используют при конструировании систем диагностики и в разработке технологий ферментативного производства различных углеводных продуктов [6, 13]. Глюкозооксидазу и пиранозоксидазу успешно применяют в создании аналитических тест-систем для различных отраслей биоиндустрии [14, 15].

Широкому аналитическому применению секретируемых оксидаз базидиомицетов препятствует недостаточный уровень их стабильности. Для увеличения резистентности грибных оксидаз к воздействию отрицательных факторов реакционной среды и сохранения их активности при многократном применении осуществляют иммобилизацию ферментов на разных носителях, в том числе наночастицах [8–10]. Для иммобилизации экстраклеточных оксидаз грибов перспективным носителем (матрицей) могут являться модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, ранее успешно применявшиеся при конструировании индикаторных систем для биомедицинской диагностики [16]. Использование МНА в этих целях определяется их высокой седиментационной стабильностью в водных суспензиях, высокой адсорбирующей способностью к молекулам пептидной природы и применимостью для биомедицинских исследований [17].

Цель работы – исследование комплексов на основе оксидаз высших грибов и наноалмазов в качестве систем индикации для биомедицинской аналитики

Материалы и методы

Принципиальная схема выделения экстраклеточных оксидаз из мицелия высших грибов с последующей иммобилизацией полученных ферментов на МНА для создания индикаторных и диагностических тест-систем биомедицинского назначения представлена на рисунке.

Объектом исследования в работе являлся светящийся базидиомицет *Neonothopanus nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов ССИБСО 836 (ИБФ СО РАН, Красноярск). Биомассу грибного мицелия в виде шарообразных пеллет получали с помощью технологии культивирования базидиомицета в погруженных условиях. Пул экстраклеточных белков (включая ферменты с оксидазной функцией) выделяли из мицелия оригинальным способом его обработки β -глюкозидазой, позволяющим осуществлять процесс в относительно мягких условиях без разрушения биомассы [18]. В полученных таким способом водных экстрактах показано наличие экстраклеточных грибных оксидаз – глюкозооксидазы и пероксидаз. В экстрактах обнаружен также ФАД-содержащий фермент, который является оксидазой со смешенной функцией и в отличие от известных пероксидаз катализирует цветную реакцию соокисления фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП) без добавления пероксида водорода. Обнаруженная экстраклеточная оксидаза выделена из экстракта в высокоочищенном виде и охарактеризована: фермент является мономерным белком с молекулярной массой около 60 кДа, проявляет максимум активности при pH 5,0 и температурах 55–70 °С, имеет кинетические характеристики (K_m и V_{max}) для фенола 0,21 мМ и 0,40 мкМ·мин⁻¹ соответственно.

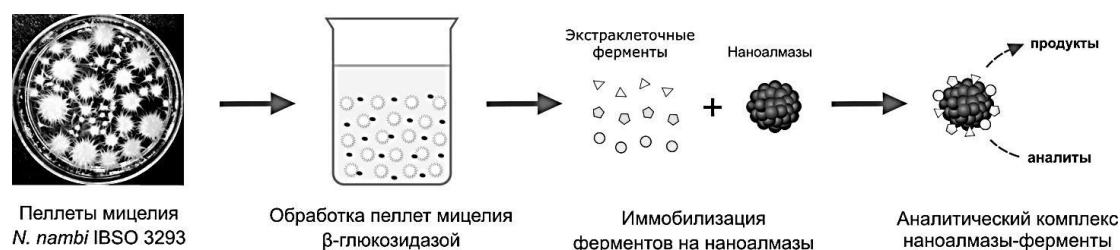


Рис. 1. Схема получения аналитических комплексов на основе грибных экстраклеточных ферментов и наноалмазов

Для конструирования аналитических систем в качестве носителя использовали МНА со средним размером кластеров в водных суспензиях 50 нм, полученные из коммерческих детонационных наноалмазов разработанным ранее способом [19].

Результаты

Иммобилизацией на МНА экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) из экстрактов мицелия *N. nambi* получен бифункцио-

нальный индикаторный комплекс МНА-ферменты. Установлено, что ферменты прочно адсорбируются наночастицами и проявляют при этом каталитическую активность. В экспериментах показано, что полученный комплекс МНА-ферменты может применяться для тестирования глюкозы и фенола в водных пробах.

Адсорбцией на МНА высокоочищенной экстраклеточной ФАД-содержащей оксидазы базидиомицета *N. nambi* сконструирована индикаторная система для определения фенола в водной среде. Установлено, что фермент прочно связывается с МНА и проявляет функциональную активность в реакции соокисления фенола с 4-ААП без добавки пероксида водорода. Обнаружен эффект значительно большего выхода продукта реакции в присутствии комплекса МНА-оксидаза, по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента. Более эффективное образование продукта реакции в присутствии комплекса обеспечивается двумя путями – ферментативно (за счет иммобилизованной оксидазы) и неферментативно (с участием ионов железа и меди на поверхности МНА). Это позволяет рассматривать МНА как усилитель реакции соокисления и прогнозировать повышение чувствительности созданной системы индикации фенола.

Продемонстрирована многократность применения сконструированных индикаторных систем для тестирования аналитов (глюкоза, фенол) в водных образцах. Установлено, что иммобилизованные на наночастицы ферменты проявляют функциональную активность при длительном (2 месяца) хранении водных суспензий комплексов МНА-оксидаза(ы) при 4 °С.

Заключение

Полученные результаты проведенных исследований открывают перспективы создания на основе МНА и оксидаз высших грибов нового класса эффективных тест-систем индикации и диагностики многократного действия (в том числе полифункциональных) для медицинской и экологической аналитики.

Список литературы

1. Soldatkin O. O., Kucherenko I. S., Pyeshkova V. M., Kukla A. L., Jaffrezic-Renault N., Elskaya A. V., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions // *Bioelectrochemistry*. 2012. V. 83. P. 25–30.
2. Li Z., Xie C., Wang J., Meng A., Zhang F. Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on chitosan-graphene and cholesterol sensing // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015. V. 208. P. 505–511.
3. Mundaca-Urbe R., Bustos-Ramirez F., Zaror-Zaror C., Aranda-Bustos M., Neira-Hinojosa J., Pena-Farfal C. Development of a bienzymatic amperometric biosensor to determine uric acid in human serum, based on mesoporous silica (MCM-41) for enzyme immobilization // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014. V. 195. P. 58–62.
4. Boujakhrou A., Jimenez-Falcao S., Martinez-Ruiz P., Sanchez A., Diez P., Pingarron J. M., Villalonga R. Novel reduced graphene oxide-glycol chitosan nanohybrid for the assembly of amperometric enzyme biosensor for phenols // *Analyst*. 2016. V. 141. P. 4162–4169.

5. Gessei T., Arakawa T., Kudo H., Saito H., Mitsubayashi K. Amperometric biosensor based on enzyme immobilization with post process for medical and multiple application // *Analyt. Lett.* 2014. V. 47. P. 1361–1374.
6. Martinez A. T., Ruiz-Duenas F. J., Camarero S. et al Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. P. 815–831.
7. Ciaurriz P., Bravo E., Hamad-Schifferli K. Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates // *J. Colloid and Interface Sci.* 2014. V. 414. P. 73–81.
8. Yang H., Wei W., Liu S. Monodispersed silica nanoparticles as carrier for co-immobilization of bienzyme and its application for glucose biosensing // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy.* 2014. V. 125. P. 183–188.
9. Tan H., Guo S., Dinh N., Luo R., Jin L., Chen C. Heterogeneous multicompartmental hydrogel particles as synthetic cells for incompatible tandem reactions // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P 663.
10. Qiu H., Li Y., Ji G., Zhou G., Huang X., Qu Y., Gao P. Immobilization of lignin peroxidase on nanoporous gold: enzymatic properties and in situ release of H₂O₂ by co-immobilized glucose oxidase // *Bioresour. Technol.* 2009. V. 100. P. 3837–3842.
11. Martinkova L., Kotik M., Markova E., Homolka L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: a review // *Chemosphere.* 2016. V. 149. P. 373–382.
12. Galperin I., Javeed A., Luig H., Lochnit G., Ruhl M. An aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization, and application in a 2-enzyme system // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 8021–8030.
13. Dubey M. K., Zehra A., Aamir M., Meena M., Ahirwal L., Singh S., Shukla S., Upadhyay R. S., Bueno-Mari R., Bajpai V. K. Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): current updates // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1032.
14. Li F, Ma W., Wu X., Wang Y., He J. Luminol, horseradish peroxidase, and glucose oxidase ternary functionalized graphene oxide for ultrasensitive glucose sensing // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 543–552.
15. Sahin S., Wongnate T., Chuaboon L., Chaiyen P., Yu E. Enzymatic fuel cells with an oxygen resistant variant of pyranose-2-oxidase as anode biocatalyst // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 107. P. 17-25.
16. Ronzhin N., Baron A., Puzyr A., Baron I., Burov A., Bondar V. Modified nanodiamonds as a new carrier for developing reusable enzymatic test-systems for determination of physiologically important substances // *Mod. Clin. Med. Res.* 2018. V. 2. P. 7–17.
17. Puzyr A. P., Baron A. V., Purtov K. V., Bortnikov E. V., Skobelev N. N., Mogilnaya O. A., Bondar V. S. Nanodiamonds with novel properties: a biological study // *Diam. Relat. Mater.* 2007. V. 16. P. 2124–2128.
18. Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., Bondar V. S. Estimating levels of light emission and extracellular peroxidase activity of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* treated with β -glucosidase // *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 2018. V. 8. P. 75–85.
19. Puzyr A. P., Bondar V. S. Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability. RU Patent No. 2252192. 2005.

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Е. В. Сорокина, Е. А. Образцова

Кафедра микробиологии биологического ф-та МГУ имени М. В. Ломоносова, г. Москва

Проблема исследований токсического воздействия наноматериалов на биологические объекты в последнее время чрезвычайно актуальна в связи с широкими перспективами их применения. Известно, что для оценки биологической активности и токсического действия различных веществ законодательно закреплены методы биотестирования, дающие ответ в каких концентрациях токсично или нетоксично исследуемое вещество. Стремительное развитие нанотехнологий в биологии, медицине и промышленности вызывает необходимость разработки методов оценки рисков наночастиц и наноматериалов. Одним из удобных и доступных методов первичной интегральной оценки действия физических факторов, различных химических веществ и их смесей, объектов окружающей среды (воды, почв, воздуха) а также и в научных исследованиях является широко используемая тест-система на основе бактериальной люминесценции.

Ранее мы показали, что при действии многослойных и одностенных углеродных трубок и коллоидных наночастиц серебра изменяется люминесценция бактерий с созданным светящимся фенотипом [1, 2].

Материалы и методы

Биотестирование на основе бактериальной люминесценции проводили с помощью генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TGI с клонированным в него lux-опероном из светящихся почвенных бактерий *Photobacterium luminescens* ZMI. Штамм получен и хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, известен как биосенсор тест-системы «Эколюм-08» [3]. В экспериментах использовали нативные клетки ночной культуры биотеста, их концентрировали центрифугированием при 6 000 g в течение 15 мин. Осадок бактериальных клеток суспендировали в дистиллированной воде до $2,5 \cdot 10^{10}$ клеток/мл, используя в кювете для анализа 0,1 мл бактериальной суспензии ($2,5 \cdot 10^9$ кл/мл).

В анализах использовали в кювете 0,9 мл наночастиц (165 мкг/мл), отличающихся химическим составом, но имеющих одинаковую трубчатую структуру. В качестве контрольного образца использовали образец наночастиц алмаза, которые, как известно, нетоксичны. Исследование морфологии клеток бактериального биотеста с созданным светящимся фенотипом образцов проведено методом сканирующей электронной микроскопии с помощью микроскопа Zeiss Merlin.

Результаты

В настоящей работе изучены воздействия наночастиц, имеющих химически различный состав, но одинаковые трубчатые структуры. В работе показали более высокую токсичность углеродных нанотрубок, в сравнении с токсичностью нанотрубок нитрита бора и дополнительно их морфологические изменения клеток бактерий (методом электронной микроскопии). Токсичное действие исследуемых наночастиц на биолюминесценцию бактерий было дополнительно подтверждено изучением некоторых независимых параметров, в частности влиянием углеродных нанотрубок на дыхание, выживаемость и морфологию (методом атомно-силовой микроскопии) клеток бактерий. Было показано, что изменения морфологии клеток наблюдали лишь в областях, покрытых значительным слоем наночастиц при длительном их контакте. Изменения люминесценции клеток биосенсора и скорости потребления ими кислорода происходят значительно раньше выраженных морфологических изменений.

Выводы

Использование независимых параметров исследования и совпадение полученных результатов токсического действия нанотрубок с изменением морфологии клеток бактерий позволяет рекомендовать метод биотестирования на основе бактериальной люминесценции для практической прогностической оценки токсичности наноматериалов и тем самым оценивать их риски.

Совпадение полученных результатов позволяет апробировать новый перспективный метод биотестирования на основе бактериальной люминесценции для прогностической оценки токсичности и тем самым оценки рисков использования наночастиц и наноматериалов для живых клеток.

Список литературы

1. N. Kobayashi, H. Izumi, Ya. Morimoto. Review of toxicity studies of carbon nanotubes. // J Occup Health 2017; 59; P. 394-407
2. E. A. Obraztsova, E. P. Lukashev, A. P. Zarubina, I. M. Parkhomenko, I. V. Yaminsky. Bactericidal action of single-walled carbon nanotubes. // Moscow Univ. Phys. 2009; 64; P. 320.
3. Danilov V. S., Zarubina A. P., Eroshnicov G. E., Solov'eva L. N., Kartashev F. V., Zavit'selsky G. B. The bioluminescent sensor systems with lux-operons from various species of luminescent bacteria. // Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2002. N3. P. 20–24.
4. Zarubina A. P., Lukashev E. P., Deev L. I., Parkhomenko I. M., Rubin A. B. Biotesting the Biological Effects of Single-Wall Carbon Nanotubes Using Bioluminescence Bacteria Test-system. // Nanotechnologies in Russia. 2009. 11–12. P. 871–875.

SEMI-SYNTHETIC OBELINS AND AEQUORINS WITH VARIOUS COELENTERAZINE ANALOGUES *

E. V. Ereemeeva, N. P. Malikova, E. S. Vysotski

*Photobiology Laboratory, Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center
“Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Krasnoyarsk, Russia*

Coelenterazine is one of the most widespread and well-studied luciferins, found in various marine bioluminescent organisms including jellyfishes, hydroids, ctenophores, copepods, ostracods, shrimps, squids, soft corals, deep sea fishes and others [1]. Coelenterazine-dependent bioluminescence is a well-known phenomenon among the marine organisms, such as cnidarians and ctenophores, which is conditioned by either Ca^{2+} -regulated photoproteins or coelenterazine-dependent luciferases. Ca^{2+} -regulated photoproteins belong to the EF-hand Ca^{2+} -binding protein superfamily and consist of a single polypeptide chain (~22 kDa) to which the preactivated coelenterazine, 2-hydroperoxycoelenterazine, is tightly bound. Photoprotein bioluminescence reaction is greatly accelerated by calcium ions which binding to the Ca^{2+} -binding sites of a protein Results in the conformational changes within the active site leading to the intensified decarboxylation of 2-hydroperoxycoelenterazine with the elimination of CO_2 and generation of the protein-bound product, coelenteramide, in an excited state.

Since the discovery of coelenterazine, a great number of its analogues have been synthesized in attempts to produce modified luciferins with higher bioluminescence intensity, altered decay rates, different emission color and other useful properties [1, 2]. However, despite the significant advances in the field, detailed information on the effect of modifications of various groups of the coelenterazine on the bioluminescent properties of photoproteins is rather fragmentary and often controversial and it is still difficult to predict the effectiveness of modified coelenterazines.

Purpose of the work – Study of semisynthetic obelin and accorin with various analogs of ceenterazine.

Materials and methods

Here, we have thoroughly investigated the effect of various modifications of imidazopyrazinone core and the 6-(p-hydroxy)-phenyl, 2-(p-hydroxy)-benzyl and 8-benzyl groups of coelenterazine on the properties of two famous Ca^{2+} -regulated photoproteins - obelin and aequorin as well as on the properties of some obelin mutants. Among the characteristics studied there were specific bioluminescence activity, fast kinetics of the bioluminescent reaction, stability,

© Ereemeeva E. V., Malikova N. P., Vysotski E. S., 2021

* The reported study was funded by RFBR and NSFC according to the research project № 20-54-53011 and by RFBR, Krasnoyarsk Territory and Krasnoyarsk Regional Fund of Science, project number 20-44-240006.

dissociation constant of the photoprotein complex formation, calcium sensitivity, bioluminescence and fluorescence spectra.

Results

Based on the experimental data, we have ascertained several coelenterazine groups which seem important for the photoprotein bioluminescence. It is interesting to note that a lot of semi-synthetic obelins and aequorins displayed different properties on being activated by the same coelenterazine analogue despite the fact that the substrate-binding cavity of these photoproteins is formed by strictly conserved amino acid residues. Thus, amino acid microenvironment of the coelenterazine molecule bound within the active site of a bioluminescent protein could be a key factor in the observed performance of certain coelenterazine analogues.

References

1. Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods; World Scientific Publishing Co.: Singapore, 2006.
2. Jiang, T.; Du, L.; Li, M. Lighting up bioluminescence with coelenterazine: strategies and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2016, 15, 466-480.

ФОТОСТАБИЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ФОТОПРОТЕИНА БЕРОВИНА С СИНТЕТИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ ЦЕЛЕНТЕРАЗИНА*

Л. П. Буракова

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50
Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79*

Беровин – светочувствительный целентеразин-зависимый Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин, отвечающий за яркое свечение гребневика *Beroe abyssicola* [1]. Несмотря на значительное сходство его функции и пространственной структуры с такими известными представителями фотопротеинов гидромедуз, как акворин и обелин, степень идентичности их аминокислотных последовательностей менее 29 %. Беровин, в отличие от фотопротеинов гидромедуз, теряет способность к биолюминесценции при облучении светом видимого диапазона длин волн. Механизм светочувствительности остается неизученным. Получение фотостабильных вариантов беровина может помочь в понимании процессов, происходящих при фотоинактивации белка. Одним из подходов является мутагенез, другим – использование аналогов целентеразина с замещением тех или иных функциональных групп. Поскольку пространственная структура комплекса апоберовина с 2-гидропероксицелентеразином пока не получена, то нет полной ясности, каким образом координируется субстрат в активном центре. Ранее с помощью сайт-направленного мутагенеза удалось идентифицировать аминокислотные остатки, предположительно формирующие внутреннюю полость беровина [2]. Некоторые из них должны быть непосредственно задействованы в координации субстрата путем образования связей с его группами. Замена данных групп в целентеразине может изменить характер взаимодействия между ним и апобелком, что, в свою очередь, может повлиять на светочувствительность белка.

Синтетические аналоги целентеразина используют как для изменения параметров биолюминесценции фотопротеинов и люцифераз, так и для изучения механизмов образования эмиттера, чувствительности к ионам кальция и других фундаментальных задач. При этом для исследования светочувствительности белков такой подход применен впервые.

Цель работы – исследование биолюминесцентной активности фотопротеина беровина с синтетическими аналогами целентеразина.

Материалы и методы

В данной работе было использовано 6 синтетических аналогов целентеразина с заменами в области 6-р-гидроксифенильного и 8-бензильного колец: A1 (2-benzyl-8-benzyl-6-(phenylethynyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-

3(7*H*)-one), A6 (2-Benzyl-8-benzyl-6-(3-hydroxyphenylethynyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one), B8 (2-Benzyl-8-benzyl-6-(benzofuranyl-2)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one), B14 (2-Benzyl-8-benzyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one), B15 (2-Benzyl-6-(5-methylfuryl)-8-(5-methylfuryl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one), B16 (2-Benzyl-6-(4-oxo-phenyl)-8-(5-methylfuryl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one) [3].

Результаты

Максимальная биолюминесцентная активность беровина наблюдалась с B14 – 5,3% от активности с нативным целентеразином, при этом светочувствительность данного комплекса была такой же, как и у беровина с нативным субстратом. Наибольшей фотостабильностью обладали комплексы беровина с аналогами целентеразина B15 и B16, сохранившие 68 и 82 % первоначальной активности через 1 ч облучения лампой накаливания, тогда как с нативным целентеразином эта величина составила 0,9 % (см. рис. 1). В B15 и B16 8-бензильное кольцо заменено на 5-метилфурил-2, что может указывать на роль в процессе фотоинактивации аминокислотных остатков ближайшего аминокислотного окружения данной группы. Согласно одной из моделей пространственной структуры беровина [2], близлежащими аминокислотными остатками к C2-заместителю являются Val58, Trp61 и Tyr133.

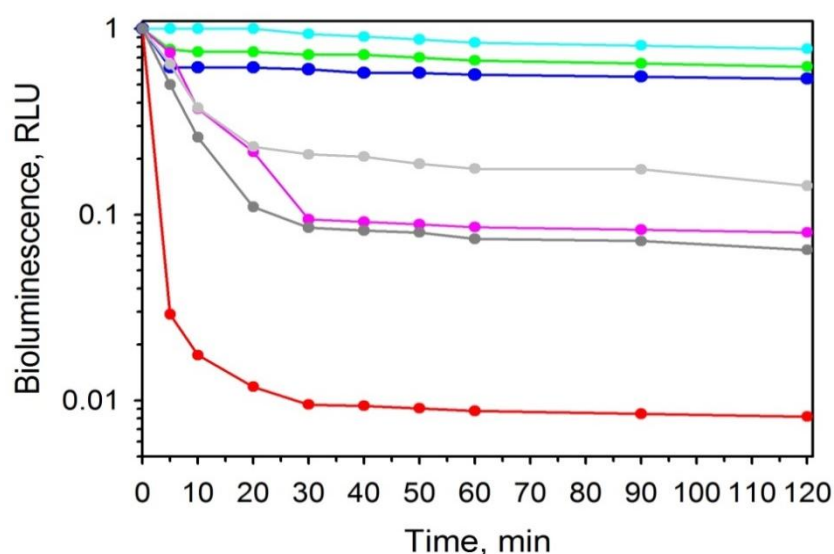


Рис. 1. Зависимость биолюминесцентной активности беровина от времени облучения с нативным целентеразином (красный) и с его синтетическими аналогами A1 (серый), A6 (темно-серый), B8 (синий), B14 (розовый), B15 (зеленый), B16 (голубой)

Замена V58H в беровине приводит как к значительному увеличению фотостабильности белка, так и к снижению его биолюминесцентной активности до 0.03 % от активности беровина дикого типа с нативным целентеразином. Это может быть обусловлено возникновением связи His58 с 8-бензильным кольцом, например, по типу катион-π взаимодействия или водородной, что может препятствовать как эффективному окислению

целентеразина, так и его фотодеградация. Появление же 5-метилфурильного на месте 8-бензильного кольца может способствовать формированию гидрофобных взаимодействий между Val58 и метильной группой, что, в свою очередь, вероятно, может повышать выход активного белка и снижать светочувствительность комплекса.

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что синтетические аналоги целентеразина могут быть использованы для получения фотостабильных вариантов беровина и для дальнейшего изучения механизмов светочувствительности.

Список литературы

1. Markova S. V., Burakova L. P., Golz S., Malikova N. P., Frank L. A., Vysotski E. S. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of Ca(2+) -regulated photoprotein *FEBS Journal*, 2012, 279, 856–870.
2. Burakova L. P., Stepanyuk G. A., Eremeeva E. V., Vysotski E. S. Role of certain amino acid residues of the coelenterazine-binding cavity in bioluminescence of light-sensitive Ca²⁺-regulated photoprotein berovin. *PhotochemPhotobiol Sci.*, 2016, 15, 691-704.
3. Jiang T., Yang X., Zhou Y., Yampolsky I., Du L., Li M. New bioluminescent coelenterazine derivatives with various C-6 substitutions. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 7008-7018.

FUNCTIONALIZED MAGNETIC NANO- AND MICROPARTICLES FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

V. V. Krasitskaya¹, R. N. Yaroslavtsev², A. N. Kudryavtsev¹,
T. A. Vereshchagina³, S. V. Stolyar^{2,4}, L. A. Frank^{1,4}

¹*Institute of Biophysics, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: vasilisa.krasitskaya@gmail.com; kirush07@mail.ru; lfrank@yandex.ru*

²*Kirensky Institute of Physics, Federal Research Center KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia;
e-mail: yar-man@bk.ru; stol@iph.krasn.ru*

³*Institute of Chemistry and Chemical Technology, Federal Research Center KSC SB RAS,
Krasnoyarsk, Russia; e-mail: tatiana_ver@mail.ru*

⁴*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia*

Magnetic nano- and microparticles are widely used in biotechnology and biomedical research due to such important properties as a magnetic response, simple preparation, small size, low toxicity, high specific surface area, and, as a consequence, high sorption capacity [1]. Due to this, they can be used as solid support in the development of highly specific and highly sensitive biosensors and as affinity sorbents for the detection or isolation/pre-concentration of various target molecules from biological fluids. The use of magnetic particles has allowed the biotechnological processes to be quick, simple, robust, and high-throughput systems.

To be used as magnetic carriers and an affinity sorbent, the surface of particles needs to be functionalized with target molecules. In the case of iron oxide nanoparticles, which are usually coated by different types of polymer or non-polymer for improving nanoparticles stability, the attachment of biomolecules to a magnetic carrier can be done through chemical modifications of functional groups of the coating agents. Among the different coating agents, various polysaccharides are often used due to their chemical and structural diversity, which is provided an excellent opportunity for the development of novel magnetic nanocomposites possessing high sorption capacity.

Materials and Methods

In the study, iron oxide nanoparticles coated by different polysaccharides such as arabinogalactan and chitosan were synthesized and the possibilities of covalent immobilization of biospecific molecules on their surface were shown. Streptavidin and protein A were used as biospecific molecules. Streptavidin is a homotetrameric protein produced by *Streptomyces avidinii*, each subunit of which binds biotin (vitamin H), forming one of the most stable noncovalent complexes ($K_d = 10\text{--}15\text{ M}$). Due to that streptavidin-biotin interaction is extensively used in molecular biology and biotechnology [2]. Protein A is a protein originally found in the cell wall of the bacteria *Staphylococcus aureus*.

It has found application in biochemical research due to its ability to bind Fc-fragment of immunoglobulins. The potential of the obtained streptavidin and protein A functionalized magnetic composites as magnetic carriers and an affinity sorbent was also evaluated.

Results

Iron oxide nanoparticles coated with starch were synthesized and their capacity as an affinity sorbent for isolation of recombinant proteins fused with maltose-binding protein was demonstrated on an example of troponin I, survivin and melanoma inhibitory activity protein purification. The maltose-binding protein binds maltose and amylopectin and is commonly used as an expression tag [3]. The magnetic properties of the obtained starch-activated nanoparticles allow the isolation of target proteins from the cytoplasmic fraction of the corresponding recombinant bacteria without the use of centrifugation and chromatographic equipment.

In the study, we also evaluated several ways of the protein covalent immobilization on aminated magnetic microparticles for their further use as a target immobilized supporting agent in specific aptamer selection process using systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). The obtained microparticles functionalized with fatty acid binding protein (FABP) showed promising Results in the FABP-specific aptamer development.

Conclusions

The use of correspondingly functionalized magnetic particles as specific carriers makes it easy to separate reaction mixtures simply by applying an external magnetic field, which allows the solution to be freely separated from particles with substances immobilized on them.

References

1. Ganapathe L. S., Mohamed M. A., Yunus R. M., Berhanuddin D. D. Magnetite (Fe_3O_4) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. *Magnetochemistry* 2020; 6:68.
2. Dundas C. M., Demonte D., Park S. Streptavidin-biotin technology: Improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 97:9343–9353.
3. Bedouelle H., Duplay P. "Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space". *European Journal of Biochemistry.* 1988; 171(3):541–9.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ У БОЛЬНЫХ С ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИМИ ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

**Н. М. Тюхтева, Ю. С. Винник,
Н. С. Соловьева, А. П. Зуев, Л. А. Полежаев**

*ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф.
В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ», кафедра общей хирургии им. проф. М. И. Гульмана,
Россия, 660022, Красноярск, Партизана Железняка, 1*

Актуальной проблемой медицины является поиск эффективных методов лечения осложнений у больных с хронической венозной недостаточностью. Трофические язвы нижних конечностей, обусловленные нарушением в работе венозной системы, обрекают таких пациентов на длительный период лечения, а, следовательно, страдает качество жизни. Вышеуказанная патология достаточно распространена среди населения различного возраста. Лечение венозных трофических язв длительный и трудоемкий процесс, поскольку явления, вызванные трофическими нарушениями, крайне тяжело поддаются лечению. Фармацевтические компании представляют множество раневых покрытий, такие как гели, губки, пленки, пленкообразующие композиции, гидроколлоиды, порошки, пасты, комбинации различных материалов, обладающих рядом преимуществ, в отличие от традиционной марли, сетки, нетканого полотна.

Оптимальными средствами в лечении длительно незаживающих трофических язв на фоне хронической венозной недостаточности являются раневые покрытия, представляющие собой своеобразную лекарственную форму. Применение таких покрытий позволяет значительно повысить эффективность лечения. Разработаны и разрабатываются новые материалы, активно применяются полимеры биологического и целлюлоза микробного происхождения, что позволяет улучшить результаты и прогнозы лечения за счет воздействия одновременно нескольких свойств. Комбинация раневых покрытий с различными препаратами является перспективным направлением научной деятельности, поскольку положительных результатов лечения больных с длительно незаживающими трофическими язвами на фоне хронической венозной недостаточности, удается достичь в разы быстрее, в сравнении с классическими методами лечения.

Цель работы – исследование эффективности применения раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) в сочетании с частицами наносеребра.

Материалы и методы

Работа выполнена на клинической базе кафедры общей хирургии имени проф. М. И. Гульмана в хирургическом отделении №2 ЧУЗ КБ «РЖД» Медицина» г. Красноярск». В исследование были включены пациенты с длительно незаживающими трофическими язвами нижних конечностей на фоне хронической венозной недостаточности ($n=45$). Группу сравнения составили больные ($n=15$), у которых в качестве раневого покрытия были использованы повязки «Гидроколл», исследуемая группа 1 ($n=15$) – с применением целлюлозы микробного происхождения, исследуемая группа 2 – с применением комбинации серебра и целлюлозы микробного происхождения). Образцы БЦ получены в Сибирском федеральном университете (патент РФ на изобретение № 2568605 «Штамм бактерий *Komagataeibacter xylinus* – продуцент бактериальной целлюлозы»). Группы больных были сопоставимы по возрасту, полу, фазе раневого процесса и площади ран. Методы исследования включали: клиническую оценку раневого процесса, планиметрию ран, pH -метрию, статистическую обработку. Сроки наблюдения за пациентами колебались от 14 до 42 суток.

Результаты

Применение комбинации целлюлозы микробного происхождения и серебра позволяет оптимизировать раневой процесс, сократить время появления и заполнения ран зрелой грануляционной тканью на 3 и 3–14 суток соответственно, повысить частоту эпителизации на 28,7 % по сравнению с традиционной терапией. У всех больных при поступлении в стационар отмечался высокий уровень эндогенной интоксикации. Согласно анализу результатов клинико-лабораторных показателей больных исследуемой группы 2, на 2 сутки от начала лечения отмечалось снижение температуры тела, а к 6–7 суткам показатели приближались к норме. Достоверное снижение показателей эндотоксикоза отмечено уже на третьи сутки наблюдения. Количество лейкоцитов в крови у больных исследуемой группы 2 до лечения составило $(18,5 \pm 1,2) \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($p < 0,05$), а к 10-м суткам лечения этот показатель не превышал нормального уровня – $(8,7 \pm 1,2) \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($p < 0,05$). В первые сутки лечения лейкоцитарный индекс интоксикации составлял $5,22 \pm 2,10$ ед., на фоне проводимого лечения достоверное снижение этого показателя происходило к 5 суткам $2,97 \pm 0,41$ ед. ($p < 0,05$).

Благодаря комбинированному методу лечения с применением раневого покрытия на основе БЦ в сочетании с наносеребром, к 6-м суткам показатель pH становился нейтральным, а к 14-м суткам среда становилась слабокислой, приближая течение раневого процесса к наиболее оптимальным значениям.

Планиметрия трофических язв, расчет индекса Л. Н. Поповой, pH -метрия, позволяли оценить клиническое течение процесса. При клинической оценке течения раневого процесса учитывались в баллах такие критерии, как сроки исчезновения отека, появление единичных грануляций, заполнение трофических язв зрелой грануляционной тканью, на-

чало эпителизации и наступление полной эпителизации. Результаты лечения показали, что в группе сравнения переход раневого процесса во вторую фазу был длительным, у 6 (40,1 %) больных к 45 суткам эпителизация не завершилась. Оценка скорости заживления ран в исследуемой группе 2 свидетельствовала о достижении хороших и удовлетворительных результатов – к 42 суткам у 13 (86,7 %) пациентов наступила полная эпителизация длительно незаживающих трофических язв.

Заключение

Применение комбинированного метода лечения, включающее раневое покрытие на основе целлюлозы микробного происхождения и серебра позволяет достичь больших успехов в лечении больных с длительно незаживающими трофическими язвами на фоне хронической венозной недостаточности в сравнении с другими выше представленными методами. Происходит более быстрое и интенсивное очищение и эпителизация трофических язв, покрытие является подобием матрицы для образования новых тканей. Смена повязки менее болезненна для пациента, на поверхности целлюлозы удаляются некрозы и фрагменты разрушенных клеток. Целлюлоза микробного происхождения в комбинации с серебром обладает рядом важных функций: служит барьером против возникновения вторичных инфекций, ограничивает потерю жидкости и одновременно с этим, обеспечивает необходимую аэрацию раны, а, следовательно, и ускорение процессов заживления таких ран.

МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Е. О. Шаврина, А. А. Савченко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»» «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Россия, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3г; e-mail: katerina.shavrina.96@mail.ru

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы во всем мире, в год от ИБС происходит около 7 млн. смертельных случаев. Терапия с применением препаратов, способных угнетать агрегацию тромбоцитов, а именно с использованием ацетилсалициловой кислоты (АСК) снижает смертность и основные неблагоприятные сердечно-сосудистые события у пациентов с ИБС. Чувствительность к АСК важна при лечении пациентов с ИБС после аортокоронарного шунтирования (АКШ). Однако все чаще стала встречаться в клинической практике пониженная чувствительность или резистентность к АСК, что существенно затрудняет лечение пациентов.

Ацетилсалициловая кислота (АСК) – наиболее широко используемый препарат для профилактики сердечно-сосудистых событий, включая неблагоприятные исходы ИБС. Кроме того, АСК используется для снижения риска окклюзии шунта после АКШ. АСК замедляет развитие атеротромбоэмболических событий, опосредованных тромбоцитами, путем необратимого ингибирования циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) тромбоцитов. Ингибирование этого фермента предотвращает синтез мощного гипертонического агента тромбоксана А₂. Тем не менее, АСК не подавляет полностью активацию тромбоцитов у значительного числа пациентов. Соответственно, результатом этого является развитие тромбоза сосудов [1].

Состояние метаболизма тромбоцитов является ключевым фактором в функциональной активности этих клеток. Соответственно и резистентность к АСК также может зависеть от работы реакций в обмене веществ в тромбоцитах. Доказано, что усиление синтеза активных форм кислорода ферментами, расположенными как внутри, так и на поверхности мембраны клеток, влияет на функциональную активацию тромбоцитов. Также доказано, что энергия, необходимая для обеспечения процессов жизнедеятельности клетки (в том числе и синтез поверхностных рецепторов) основана на гликолизе с сохранением митохондриальных функций.

Цель исследования – определение особенности метаболизма тромбоцитов больных ИБС для дальнейшего устранения резистентности клеток к АСК.

Материалы и методы

В исследовании использовали венозную кровь пациентов с ИБС до АКШ, после АКШ (1 день) и после проведенной терапии пациентам с применением АСК (10 дней) и кровь относительно здоровых доноров. Показателями метаболизма тромбоцитов служили: активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ, усиление активационных способностей по синтезу активных форм кислорода (АФК) с помощью добавления индуктора реакции аденозиндифосфата (АДФ).

Результаты

Достоверно выявлено, что активность глюкозо-6 фосфатдегидрогеназы в тромбоцитах больных ИБС, чувствительных и резистентных к АСК, снижена относительно показателей контрольной группы. Этот фермент является ключевым и инициализируется в пентозофосфатном цикле, и его роль в метаболизме клеток вызывает повышенный интерес, в том числе для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) также был снижен в тромбоцитах пациентов в независимости от чувствительности, однако у резистентных больных активность этого фермента в динамике (до, после АКШ и после терапии) приходит в норму (равна показателям контрольной группы), а у чувствительных пациентов активность ЛДГ в динамике уменьшается. Эта ферментативная реакция определяет превращение лактата в пируват, который можно использовать для аэробных процессов. Активность НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы (НАДН-ЛДГ) в тромбоцитах пациентов чувствительных и резистентных к АСК была увеличена по сравнению с контрольными значениями до АКШ, но в динамике снижается. Активность НАДН-ЛДГ характеризует интенсивность анаэробного гликолиза, определяющего снижение значения анаэробной энергии тромбоцитов. Наиболее значимыми показателями метаболизма тромбоцитов является стабильная активность глутатитон-редуктазы, на основании чего можно сделать вывод о стабильности перекисных процессов. Выявлено снижение интенсивности переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза у чувствительных тромбоцитов за счет снижения активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ). У резистентных клеток активность ГЗФДГ увеличивается, а это значит, что работа ключевого фермента липидного обмена приходит в норму.

Исследованы уровни синтеза АФК тромбоцитами у пациентов с ИБС, чувствительных и резистентных к АСК до и после АКШ, с помощью хемилюминесцентного анализа. Люцигенин-усиленная хемилюминесценция характеризует активность Nox2 (поверхностного фермента) и, соответственно, уровень синтеза супероксидных радикалов. Мы обнаружили, что активность Nox2 в тромбоцитах пациентов

с чувствительных к АСК до и после АКШ была достоверно выше, чем у лиц контрольной группы. Общий уровень синтеза и кинетика синтеза супероксидного радикала у больных этой группы практически не изменялись в динамике наблюдения. Тромбоциты больных чувствительных к АСК с ИБС активнее синтезировали супероксидный радикал, но время активации Nox2 было увеличено. Активация Nox2 была обнаружена, когда тромбоциты находились в состоянии относительного покоя и во время их функциональной активации. Кроме того, время активации фермента было больше, когда тромбоциты находились в состоянии покоя и во время их функциональной активации. Активность Nox2 в тромбоцитах у пациентов резистентных к АСК до и после АКШ была ниже, чем у пациентов чувствительных к АСК. Однако кинетика синтеза супероксидного радикала тромбоцитами у пациентов этой группы достоверно отличалась от таковой у пациентов чувствительных к АСК. Во-первых, скорость активации Nox2 тромбоцитов в состоянии относительного покоя (спонтанная люцигенин-усиленная хемилюминесценция) у пациентов резистентных к АСК до и после АКШ была ниже, чем у пациентов чувствительных к АСК, и соответствовала контрольным значениям. Во-вторых, скорость увеличения синтеза супероксидного радикала при АДФ-зависимой активации тромбоцитов у больных резистентных к АСК соответствовала уровням, выявленным в контрольной группе и у больных и в первые сутки после операции, была еще больше. Таким образом, активность Nox2 в тромбоцитах резистентных к АСК у пациентов формируется двумя механизмами: уровнем мембранной экспрессии (более низким, чем у пациентов чувствительных к АСК) и регуляторными процессами, которые нивелируются при активации клеток. Ранее было показано, что низкая активность Nox2 вызывает снижение функциональной активности тромбоцитов.

Уровень синтеза вторичных АФК исследовали с помощью люминол-усиленной хемилюминесценции. Мы не обнаружили статистически значимых различий в уровнях синтеза вторичных АФК (усиленной люминолом хемилюминесценции) в тромбоцитах у пациентов с ИБС чувствительных и резистентных к АСК до и после АКШ. Уровень синтеза вторичных АФК в тромбоцитах у больных чувствительных к АСК был повышен относительно контрольных значений до и после АКШ. Синтез вторичных АФК в тромбоцитах больных резистентных к АСК был повышен относительно контрольных значений после АКШ. При добавлении индуктора реакции АДФ показатели не отличались от тех показателей спонтанной реакции.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что изменения метаболизма тромбоцитов у больных ИБС в зависимости от чувствительности к АСК в большей степени связаны с ферментативными реакциями, определяющими активность энергетических процессов (как анаэробных, так и аэробных). В целом активация тромбоцитов существенно зависит от интенсивности потока субстрата че-

рез гликолиз. Механизм развития резистентности к АСК, предложенный ранее, заключался в оттоке метаболитов для синтеза простагландинов и, соответственно, в снижении активности окислительных процессов в тромбоцитах. Однако механизмы влияния активности ферментов на функциональную активность клеток могут быть определены не только их ролью в синтетических и энергетических процессах. В связи с тем, что метаболитические интермедиаты (АФК и другие продукты ферментативных реакций) не только оказывают метаболитическое действие, но и влияют на регуляторные и эпигенетические процессы, можно сделать вывод, что чувствительность к АСК может определяться метаболизмом тромбоцитов.

Список литературы

1. Grinshtein, YI. Resistance to Acetylsalicylic Acid in Patients with Coronary Heart Disease Is the Result of Metabolic Activity of Platelets / YI. Grinshtein [et al] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2020. – Aug. – № 13(8). – P. 178.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ФЕНОТИПИЧЕСКУЮ ПОЛЯРИЗАЦИЮ И ЛИПИДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ МАКРОФАГОВ

Н. Г. Мензянова, С. А. Пятина, Е. И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

Макрофаги (МФ) – гетерогенная клеточная популяция, играющая ключевую роль в реакциях клеточного иммунитета и воспалительных процессах. Фенотипическая вариабельность МФ связана с процессами поляризации: микроэнvironmentальные факторы могут индуцировать дифференцировку наивных МФ в провоспалительный М1-фенотип или в противовоспалительный М2-фенотип.

Поляризация наивных МФ реализуется в изменениях спектра поверхностных CD-антигенов, секретируемых цитокинов, изменениях активности фагоцитоза, перестройках липидного метаболизма и окислительно-восстановительного гомеостаза. Для реализации физиологически адекватных процессов необходима определенная динамика М1/М2-фенотипов. Доминирование одного из вариантов поляризации приводит к развитию патологий. В настоящее время регуляция активности процессов М1/М2 поляризации МФ рассматривается как перспективная терапевтическая стратегия. Это определяет актуальность изучения процессов поляризации МФ *in vivo* и в модельных системах *in vitro*.

Стандартные протоколы поляризации МФ *in vitro* предусматривают использование в качестве индукторов поляризации LPS, IFN-gamma (М1-фенотип) и IL-4, IL-13 (М2-фенотип). Однако многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют, что в качестве индукторов поляризации могут выступать наночастицы. Репрограммирующие эффекты наночастиц реализуются в перестройках секретома и липидома МФ. Эффекты наночастиц определяются их физико-химическими свойствами, зависят от размеров, формы, концентрации и продолжительности воздействия.

В условиях современной цивилизации наночастицы активно используются в сферах, связанных со здоровьем человека. Это определяет необходимость изучения наночастиц как индукторов и регуляторов процессов поляризации МФ и прогнозирования их роли в патогенезе различных заболеваний человека.

Цель исследования – изучение влияния наночастиц (НЧ) золота на активность формирования липид-нагруженных МФ в процессе М1/М2 поляризации *in vitro*.

Результаты на 9-е сутки культивирования МФ были представлены морфологически гетерогенной клеточной популяцией. В цитоплазме клеток различной морфологии наблюдались высококонтрастные везикуляр-

ные структуры, которые были определены как липидные капли (ЛК). Клетки с ЛК были определены как липид-нагруженные МФ. НЧ золота увеличивали численность липид-нагруженных МФ, по сравнению с контрольным вариантом. Эффективность мелких НЧ золота размером 6 нм как индукторов биогенеза ЛК была выше, чем НЧ размером 25 нм. На средах с НЧ золота численность липид-нагруженных МФ была в 2 раза меньше, чем на среде с ИК, классическими индукторами биогенеза ЛК. В условиях комбинированного воздействия НЧ золота и иммунных комплексов (ИК) количество липид-нагруженных МФ было значительно выше, чем в вариантах однофакторного воздействия (в среднем в 2 раза).

На следующем этапе работы для оценки процессов M1/M2 поляризации определяли активность экскреции цитокинов, простагландинов группы E2 (ПГЕ2), лейкотриенов группы B4 (ЛТВ4). НЧ золота снижали уровень интерлейкина-6 (в 18 раз) и повышали активность продукции ЛТВ4 (в 5,5 и 7,4 раз, соответственно, для мелких и крупных НЧ), по сравнению с контролем.

В условиях комбинированного воздействия (НЧ золота+ИК) были выявлены совершенно иные закономерности: наблюдалось снижение уровня ИЛ-6 (в 43 и 67 раз, соответственно, для мелких и крупных НЧ), ПГЕ2 (в 9,5 раз) и ЛТВ4 (в 1,5 раза) по сравнению с контролем.

Заключение

Полученные результаты позволяют заключить, что под воздействием наночастиц золота формируются M2a- и M2c-фенотипы макрофагов, для которых характерен биогенез ЛК из липидов, синтезированных *de novo*. С ИК связано формирование M2b-фенотипа МФ, у которых в ЛК депонируются липиды, которые клетка включает в метаболизм в результате неконтролируемого фагоцитоза ИК.

Благодарности

Авторы приносят благодарность Шабанову А. В. и Немцову И. В. (Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН) за помощь в проведении электронно-микроскопического анализа.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ КАТИОНИТА КУ-2-8, МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

Р. Р. Хайдаров¹, О. У. Гапурова¹,
И. Т. Гарипов¹, И. Г. Галиулин¹, С. Ю. Евграфова^{2,3}

¹Институт ядерной физики АН РУз, Узбекистан, Ташкент

²Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, Россия, Красноярск

³Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск

Показано, что введение наноразмерных включений серебра в сильнокислотный катионит КУ-2-8 при помощи боргидридного восстановления (см. рис. 1) позволяет получать наноконпозиты с различным распределением восстановленного серебра в фазе ионообменника. Согласно снимкам модифицированного катионита, полученным на сканирующем электронном микроскопе, коллоидные частицы серебра на поверхности КУ-2-8 имеют сферическую форму, а их размер варьирует в диапазоне от десятков до сотен нанометров. Исследования микробиологической активности созданного наноконпозитного катионита методом диффузии в агаре [1, 2] продемонстрировали выраженное антибактериальное действие его гранул на тест-культуры *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aureobasidium*, *Penicillium*.



Рис. 1. Образование коллоидных частиц серебра в структуре ионообменной матрицы КУ-2-8 [3]

Использование наночастиц серебра в структуре катионита позволяет предотвратить рост биопленок на его поверхности в процессе эксплуатации (особенно в жарких климатических условиях), и тем самым значительно увеличить срок его службы. Показано, что КУ-2-8 с нановключениями серебра также может выполнять функцию удаления растворенного кислорода из воды [4]. В 2020 г. в Институте ядерной физики Академии Наук Республики Узбекистан освоено производство систем химводоподготовки с использованием разработанного наноконпозитного катионита, предназначенных для повышения экономичности, ликвидации накипи и отложений на теплопередающих поверхностях в котельном оборудовании.

Список литературы

1. Garipov I. T., Khaydarov R. R., Gapurova O. U., Khaydarov R. A., Firdaus M. L., Efimova I. L., Evgrafova S. Yu. "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobial prophylaxis" *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2019, 12(3), 266–276.
2. Гарипов И. Т., Юлдашев А. Б., Хайдаров Р. Р., Гапурова О. У., Садиков И. И., Прудникова С. В., Евграфова С. Ю. Получение и применение катионита с нановключениями серебра // *Управление техносферой: электрон. журнал*, 2020. Т.3. Вып.3. С. 386–400.
3. Khaydarov R., Abdukhakimov M., Garipov I., Sadikov I., P. T. Krishnamurthy, S. Evgrafova. Silver-containing Cation Exchange Resin: Synthesis and Application // *Materials science – 2021, Early Access, ISSN 1392–1320*.
4. Garipov I. T., Khaydarov R. R., Gapurova O. U., Khaydarov R. A., M. Lutfi Firdaus, Prudnikova S. V., Evgrafova S. Y. (2021) Silver nanoparticles as potential antimicrobial agent // *An Essential Guide to Antimicrobial Agents (Nova)*. – Editor: Ernesto Macias, Nova Science Publishers, Inc. New York pp.73–88.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННОГО БОРГИДРИДНЫМ МЕТОДОМ

Д. О. Копнина, Д. И. Жевак, А. А. Шлафер

*Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79;
e-mail: dkopnina99@mail.ru*

Антимикробные свойства наночастиц серебра (НС) используются в настоящее время в различных областях прикладной науки. К примеру, НС используется в качестве стерилизующего агента в медицине, косметической, лакокрасочной и текстильной промышленности [1].

Для того чтобы подействовать на микроорганизм, антисептик должен проникнуть в клетку и подействовать на ферментативную систему микроорганизма. Наиболее эффективными являются органические антисептики, которые в большей степени подавляют различные ферменты [2].

Общий механизм антимикробного воздействия НС направлен на его взаимодействие с клеточной мембраной, состоящей из особых белков (пептидогликанов), соединенных аминокислотами, для обеспечения механической прочности и стабильности клетки. Серебро взаимодействует с внешними пептидогликанами, блокируя их способность передавать кислород внутрь клетки бактерии, что приводит к нарушению кислородного обмена микроорганизма и его гибели [3].

Выбор наночастиц серебра, как агента защиты от биоповреждений, обусловлен его нелетучестью, как в обычных условиях, так и при сгорании, и эффективностью растворов низких концентраций. Бактерицидные свойства металлического наносеребра связаны с его медленным окислением и высвобождением ионов Ag^+ в окружающую среду, поэтому представляется перспективным использование препаратов наносеребра как особого класса биоцидных агентов. Наночастицы обладают высокой антибактериальной эффективностью благодаря своей развитой поверхности, обеспечивающей максимальный контакт с окружающей средой. Кроме того, они достаточно малы и способны проникать сквозь клеточные мембраны, влиять на внутриклеточные процессы [1].

Эффект уничтожения бактерий препаратами серебра чрезвычайно велик. Он в 1 750 раз сильнее действия той же концентрации карболовой кислоты и в 3,5 раза сильнее действия сулемы. Уже при концентрации 0,1 мг/л серебро обладает выраженным фунгицидным действием. Растворы серебра являются самым эффективным средством при непосредственном соприкосновении с поверхностями, гноящимися и воспалёнными вследствие бактериального заражения [4].

В настоящее время идёт поиск эффективных и безвредных для человека антисептиков и методов защиты от микроорганизмов, в том

числе и патогенных. Данное направление работы является очень актуальным, так как, несмотря на то, что свойства наночастиц серебра являются предметом пристального изучения, также рассматриваются его комбинации с другими антимикробными агентами, которые могут усиливать его активность или смещать спектр действия. Ведётся поиск новых оптимальных сочетаний для достижения наибольшего антимикробного или фунгицидного эффекта.

Цель работы – исследование действия растворов коллоидных наночастиц серебра, полученных боргидридным методом, на микрофлору окружающей среды, эпифитную микрофлору семян пшеницы и микроскопические грибы.

Материалы и методы

В ходе работы были использованы растворы коллоиднонаносеребра, которые были синтезированы и предоставлены Институтом ядерной физики, г. Ташкент, Узбекистан:

1. Раствор 1 бесцветный. Содержит: серебро – 40 мг/л, боргидрид натрия – 5 мг/л, стабилизатор ≥ 10 мг/л
2. Раствор 2 желтого цвета. Содержит: серебро – 40 мг/л, боргидрид натрия – 10 мг/л, стабилизатор – 1,5 мг/л
3. Раствор 3 светло-желтого цвета. Содержит: серебро – 40 мг/л, боргидрид натрия – 10 мг/л, стабилизатор ≤ 10 мг/л.

Исследование свойств коллоидных растворов НС проводилось в отношении тестовых культур бактерий: *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus spp.*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus patagoniensis*; и микроскопических грибов: *Penicillium citrinum*, *Fusarium sp.*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*.

В ходе экспериментов использовался метод посева на плотные питательные среды (среда Сабура, питательный агар) с дополнительными высеками для внесения исследуемых растворов.

Результаты

Наиболее выраженную чувствительность в отношении всех исследуемых растворов НС показал микроскопический гриб *Alternaria tenuis*: зона отсутствия роста была наибольшей во всех исследуемых вариантах посева (табл. 1). Наибольшей устойчивостью к исследуемым растворам НС показали грибы рода *Fusarium sp.*

Таблица 1

Степень эффективности действия растворов коллоидного серебра на микроскопические грибы

(* – наименьшее воздействие, *** – наибольшее воздействие)

Название гриба	Раствор 1	Раствор 2	Раствор 3
<i>Penicillium citrinum</i>	**	*	***
<i>Fusarium sp.</i>	*	**	*
<i>Alternaria tenuis</i>	***	***	**
<i>Aspergillus niger</i>	**	**	**

Наибольшую чувствительность к растворам коллоидного серебра показали выделенные из почвы бактерии рода *Bacillus* (*Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*). В то же время, бактерии *Bacillus pumilus*, выделенные из воды, показали меньшую чувствительность в отношении НС (табл. 2).

Таблица 2

Зона отсутствия роста бактерий (мм) около высечек
с растворами коллоидного серебра

	Раствор 1	Раствор 2	Раствор 3
Бактерии, выделенные из воды			
<i>Bacillus cereus</i>	2	3	0
<i>Bacillus patagoniensis</i>	1	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	2	0	1
<i>Bacillus cereus</i>	2	3	0
<i>Bacillus pumilus</i>	0	0	0
<i>Bacillus pumilus</i>	0	0	0
Бактерии, выделенные из почвы			
<i>Bacillus subtilis</i>	3	4	0
<i>Bacillus spp</i>	2	2	2

В отношении эпифитной микрофлоры семян пшеницы, исследуемые растворы НС активнее всего проявлялись с различными штаммами *Micrococcus luteus* (табл. 3), бактерии рода *Bacillus* (*Bacillus subtilis* и *Bacillus patagoniensis*) были менее чувствительны или устойчивы к НС.

В целом, растворы (1) и (2) (концентрации см. Материалы и методы) проявили более ярко выраженную антибактериальную активность, по сравнению с раствором (3). По всей вероятности, данные свойства были связаны с различными концентрациями стабилизатора в исследуемых растворах.

Таблица 3

Зона отсутствия роста (мм) бактерий, выделенных из семян пшеницы,
около высечек с растворами коллоидного серебра на 1 и 3 сутки

Вид бактерий	Раствор 1		Раствор 2		Раствор 3	
<i>Micrococcus luteus</i> (штамм 9)	7	7	5	5	5	5
<i>Micrococcus luteus</i> (штамм 12)	5	5	3	0	4	4
<i>Bacillus subtilis</i>	1	2	2	2	1	1
<i>Bacillus patagoniensis</i>	1	1	1	1	0	0

Заключение

Воздействие коллоидных растворов НС на микроскопические грибы не проявляло зависимости от концентрации присутствующих в растворах стабилизаторов, активность НС в большей степени зависела от вида гриба.

Наибольшую активность в отношении бактериального сообщества показали растворы коллоидного серебра 1 и 2.

Бактерицидный эффект НС в отношении бактерий одного вида, выделенных из различных местообитаний (например, *Bacillus subtilis*), проявлялся в различной степени. Наиболее устойчивы к НС были бактерии, выделенные из воды, наименее – из почвы и ризосферы семян пшеницы.

Список литературы

1. Крутяков Ю. А. и др. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – №. 3. – С. 242–269.
2. Кривушина А. А., Горяшник Ю. С. Способы защиты материалов и изделий от микробиологического поражения (обзор) // Авиационные материалы и технологии. 2017. №2 (47)
3. Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра // Вестник Казанского технологического университета. 2012. №14. – С. 170–171.
4. Иванов В. Н. Некоторые экспериментальные и клинические результаты применения катионов серебра в борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами / В. Н. Иванов, Г. М. Ларионов, Н. И. Кулиш, М. А. Лутцева и др. // Серебро в медицине, биологии и технике. Сиб.отд. РАМН. – 1995. – №4. – С. 53–62.

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ И БОРГИДРИДНЫМ МЕТОДОМ

П. А. Аболенцева

*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79;
e-mail: polina18.ti@gmail.com*

Потребность в разработке новых, недорогих и эффективных противомикробных средств, не зависящих от бактериальной устойчивости, возродила интерес к изучению антимикробных свойств наночастиц серебра и его соединений. С развитием нанотехнологий появляется большое количество материалов с уникальными свойствами, открывая спектр приложений и исследовательских возможностей [1]. Наночастицы серебра (AgNP) в настоящее время широко используются в разных сферах промышленности: производство антимикробных покрытий и текстиля, упаковки для продуктов питания, косметических средств, фильтрующих материалов, нано-биосенсоров и др. [2]. Наночастицы серебра применяются в качестве антибактериального покрытия в изделиях медицинского назначения, таких как сердечно-сосудистые имплантаты, перевязочные материалы, катетеры, ортопедические имплантаты, зубные композиты [3]. Местное нанесение наночастиц серебра на раны способствует ускорению и ускорению процесса заживления; кроме того, они играют роль в модуляции цитокинов, участвующих в восстановлении тканей [4]. Эти уникальные свойства позволяют широко применять AgNP для профилактики и лечения патогенных заболеваний, а также для производства противомикробных и самоочищающихся поверхностей [5].

Цель работы – оценить антимикробную активность растворов и материалов, содержащих наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом и методом восстановления боргидридом натрия, в отношении типичных штаммов бактерий, выделенных из окружающей среды, и санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ).

Материалы и методы

Получение наночастиц серебра проводилось электрохимическим методом [6], а также методом восстановления боргидридом натрия. Материалы для производства медицинских масок (мельтблаун и внутренняя часть медицинской маски) образцы мембранно-осмотической системы, обработанные растворами, содержащими AgNP, были получены в Институте ядерной физики АН Узбекистана (г. Ташкент). Обработку ткани проводили опрыскиванием или погружением в спиртово-водный коллоидный раствор AgNP. Исследование антимикробных свойств материалов проводили в от-

ношении 12 штаммов бактерий, выделенных из воздуха, полевой почвы и семян пшеницы, а также в отношении СПМ – референтных штаммов *E. coli* 25922 и *Staphylococcus aureus* 25923. Оценку антибактериальной активности AgNP проводили методом диффузии на агаризованной питательной среде МПА и методом «time-kill» [7].

Результаты

Из объектов внешней среды было выделено и идентифицировано 12 типичных изолятов микроорганизмов: из воздуха учебных аудиторий ИФ-БиБТ, из полевой почвы, с семян пшеницы; бактерии были идентифицированы как *Bacillus spp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus patagoniensis* и *Micrococcus luteus*. Максимальной антимикробной активностью в отношении тест-культур бактерий родов *Bacillus* и *Micrococcus*, а также санитарно-показательных видов *E. coli* и *S. aureus*, обладали растворы, полученные электрохимическим методом: 7 из 14 изолятов бактерий, проявляли чувствительность. В присутствии 3 % и 6 % пероксида водорода в растворе наночастиц серебра зоны отсутствия роста у чувствительных бактерий возрастали и составляли от 35 до 61 мм (см. рис. 1). Высокую устойчивость к растворам наночастиц серебра с пероксидом водорода проявили изоляты бактерий, выделенные из воздуха. Растворы наносеребра, полученные боргидридным методом обладали более слабой антимикробной активностью: зоны отсутствия роста тест-культур бактерий составляли от 1 до 7 мм. Наименьшей активностью обладал раствор с низким содержанием стабилизатора (1,5 мг/л) Изоляты *Bacillus spp.* 8, *Micrococcus luteus* 9, *Micrococcus luteus* 12 и *Bacillus subtilis* 13 проявили чувствительность ко всем растворам, полученным боргидридным методом.

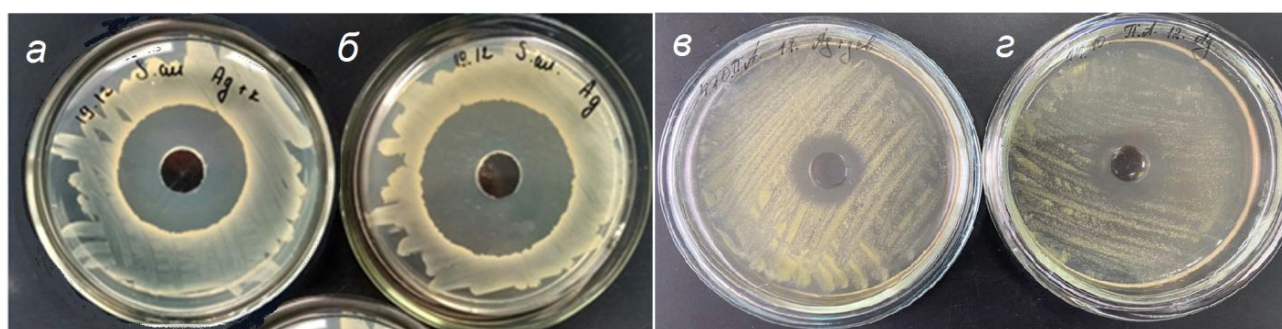


Рис. 1. Зоны отсутствия роста бактерий *S. aureus* (а, б) и *M. luteus* (в, г) под действием растворов с наночастицами серебра: а – раствор AgNP с пероксидом водорода 3 %; б – раствор AgNP с пероксидом водорода 6 %; в – раствор AgNP с дигидрохверцетином; г – раствор AgNP без добавок

Анализ, проведенный диффузионным методом, не выявил антимикробные свойства материалов, обработанных растворами с наночастицами серебра, полученными восстановлением боргидридом натрия; все тест-культуры бактерий проявили устойчивость к материалам внутренней части медицинской маски и образцам обратноосмотических мембран. Диффузи-

онный метод показал, что 5 из 12 изолятов исследуемых бактерий были чувствительны к материалу мельтблаун, обработанному раствором с наночастицами серебра, полученными электрохимическим методом. Диаметры зон отсутствия роста составляли от 19 до 27 мм. Метод «*time-kill*» выявил антимикробные свойства материала мельтблаун в отношении референтного штамма *E. coli*, после 6 часов экспозиции жизнеспособных микроорганизмов обнаружено не было.

Заключение

Наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом, проявляли более высокую активность в отношении тест-культур бактерий, включая санитарно-показательные. Материал мельтблаун, обработанный раствором AgNP, проявлял антибактериальное действие при контакте с клетками *E. coli*.

Список литературы

1. Mody V. V. et al. Introduction to metallic nanoparticles // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2010. – Т. 2. – № 4. – С. 282.
2. Chaloupka K., Malam Y., Seifalian A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications // Trends in biotechnology. – 2010. – Т. 28. – № 11. – С. 580–588.
3. Rafique M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications // Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2017. – Т. 45. – № 7. – С. 1272–1291.
4. Tian J. et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing // ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery. – 2007. – Т. 2. – № 1. – С. 129–136.
5. Silver nanoparticles against *Salmonella enterica* serotype typhimurium: Role of Inner Membrane Dysfunction // Current microbiology. – 2017. – Т. 74. – № 6. – С. 661–670.
6. Khaydarov R. R. et al. Using silver nanoparticles as an antimicrobial agent // Biodefence. – Springer, Dordrecht, 2011. – С. 169–177.
7. Peran J. et al. Antimicrobial effectiveness of cellulose based fabrics treated with silver nitrate solution using plasma processes. // Tekstilec – 2017. – Т. 60. – № 4. – С. 247–253.

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В КОМБИНАЦИИ С ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНОМ

Е. В. Василенко

*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79;
e-mail: liza_vasilenko_vasilenko@mail.ru*

Наночастицы серебра (*AgNPs*) представляют интерес для исследования из-за их антимикробной активности. Это ценное свойство стало особенно актуальным, в связи с распространением антибиотикорезистентности среди штаммов болезнетворных бактерий [1]. Бактерицидные свойства серебра основаны на его медленном окислении, в результате чего высвобождаются ионы Ag^+ в окружающую среду, кроме того, наночастицы серебра достаточно малы и способны проникать сквозь клеточные мембраны, влияя на внутриклеточные процессы [2]. Для повышения эффективности наночастиц серебра их применяют совместно с другими биологически активными компонентами: хитозан, коллаген, альгинат натрия и др. Раствор пероксида водорода обладает мощным бактерицидным действием и широко применяется в медицинской практике [3]. Дигидрокверцетин – биофлавоноид с широким спектром действия и высокой антиоксидантной активностью, обладающий антимикробным действием. Он также используется в медицине и пищевой промышленности [4]. Комбинации *AgNPs* с другими антимикробными агентами может усиливать их активность или изменять спектр действия, поэтому поиск новых сочетаний и исследование их антимикробной эффективности – одно из актуальных направлений исследования.

Цель работы – исследование антибактериальных свойств растворов наночастиц серебра в комбинации с пероксидом водорода и дигидрокверцетином в отношении тестовых культур бактерий.

Материалы и методы

В работе были исследованы антимикробные свойства коллоидных растворов наночастиц серебра, полученных электрохимическим и боргидридным методами, в отношении тестовых культур бактерий: грамотрицательных – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и грамположительных – *Bacillus mycoides*, *Micrococcus luteus*. Растворы, полученные электрохимическим методом, содержали 20 мг/л *AgNPs*, а также сочетание *AgNPs* и дигидрокверцетина. Растворы пероксида водорода 3 % и 6 % содержали 1 мг/л *AgNPs*. Растворы, полученные боргидридным методом, содержали 40 мг/л наносеребра, боргидрид натрия (5 или 10 мг/л) и полиаминные стабилизаторы. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) испытуемых растворов проводили

на суспензиях суточных культур тестовых микроорганизмов (0,5 ед. МакФарланда) [5].

Результаты

Подавление роста грамположительных бактерий *M. luteus* и *B. mycooides* происходит при концентрации *AgNPs* 200 мл/л. У грамотрицательных бактерий МИК раствора составила 200 мл/л для *E. coli* и 400 мл/л для *P. aeruginosa*. В отношении *E. coli* действие раствора *AgNPs* было бактерицидное. В присутствии дигидрохверцетина при тех же концентрациях наночастиц серебра действие раствора *AgNPs* проявлялось только как бактериостатическое. В сочетании с 6 % H_2O_2 для *E. coli* и *B. mycooides* МИК раствора составила 15 мг/л, а для *P. aeruginosa* и *M. luteus* – 10 мл/л. Раствор пероксида водорода 3 %, содержащий наночастицы серебра (15 мкг/л), показал более выраженный антимикробный эффект, чем контрольный раствор пероксида водорода без наночастиц.

Электронно-микроскопические исследования показали, что размер наночастиц серебра, полученных разными методами, отличался. При использовании электрохимического метода средний размер наночастиц составлял менее 10 нм [6], а при получении боргидридным методом – от 10 до 100 нм. В растворе, который показал очень слабую активность, размер частиц был наибольшим – около 100 нм.

Таблица 1

Значения МИК растворов с наночастицами серебра
в отношении тестовых штаммов бактерий (мл/л)

Тип раствора	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus mycooides</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Электрохимический метод получения <i>AgNPs</i>				
<i>AgNPs</i>	200	400	200	200
<i>AgNPs</i> + дигидрохверцетин	400	200	200	200
<i>AgNPs</i> + пероксид водорода 3 %	15	15	15	15
<i>AgNPs</i> + пероксид водорода 6 %	15	10	15	10
Пероксид водорода 3 % (контроль)	15	20	20	15
Боргидридный метод получения <i>AgNPs</i>				
<i>AgNPs</i> + боргидрид 5 мг/л + стабилизатор 10 мг/л	400	400	200	400
<i>AgNPs</i> + боргидрид 10 мг/л + стабилизатор 1,5 мг/л	400	200	400	100
<i>AgNPs</i> + боргидрид 10 мг/л + стабилизатор 10 мг/л	100	400	200	100

Антибактериальные свойства наночастиц серебра, полученных боргидридным методом, проявлялись сильнее с уменьшением размера наночастиц. Раствор, содержащий наночастицы размером около 100 нм, подавлял рост только *B. mycoides*, МИК составляла 8 мг/л. Растворы со средним размером наночастиц серебра около 20 нм, оказывали наиболее эффективное антибактериальное действие, особенно в отношении видов *M. luteus* и *E. coli*, для которых МИК составила 4 мг/л. Для *AgNPs*, полученных боргидридным методом, действие испытуемых растворов на бактериальные клетки проявлялось как бактериостатическое.

Заключение

Антимикробная активность наночастиц серебра, полученных электрохимическим методом, была выше, чем у наночастиц, полученных восстановлением боргидридом натрия, что объясняется более мелким размером *AgNPs*. Комбинация *AgNPs* с пероксидом водорода повышала эффективность испытуемых растворов, тогда как дигидрокверцетин ослаблял антимикробное действие наночастиц серебра.

Список литературы

1. Крутяков Ю. А. и др. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – №. 3. – С. 242–269.
2. Яманова Р. Р., Николаенко Г. Р. О применении наночастиц серебра в легкой промышленности // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16. – №. 22.
3. Матренинская Е. С. Новое поколение дезинфицирующих средств на основе пероксида водорода // Медицинский алфавит. – 2011. – Т. 1. – №. 5. – С. 40–40.
4. Нифантьев Э. Е. и др. Химическая модификация и биологическая активность флавоноида дигидрокверцетина // Наука и школа. – 2012. – №. 6.
5. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 5. / Под ред. Лабинской А. С., Волиной Е. Г. – М.: Бином, 2008. – 1080 с.
6. Khaydarov R. Silver nanoparticles environmental and human health impacts // Nanomaterials. – 2008. – P. 287–297.

BIODEGRADABLE MICROCARRIERS FOR HERBICIDE DELIVERY

**Sabu Thomas^{1,2}, Raji V², Hanna. J. Maria²,
E. G. Kiselev^{1,3}, I. V. Nemtsev⁴, A. A. Sukhanova^{1,5}**

¹*Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Av., Krasnoyarsk 660041, Russia*

²*International and Inter University Centre for Nanoscience and Nanotechnology, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, 686560, India*

³*Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russia*

⁴*Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, 50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

⁵*Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russia*

A new line of research is development and agricultural use of new-generation pesticides with controlled release of active ingredients embedded in biodegradable materials, which are degraded by soil microflora to harmless products. The use of such formulations reduces amounts of pesticides applied to soil and enables their slow release and controlled delivery. The crucial aspect of constructing such preparations is the availability of appropriate materials with the special properties. Biodegradable materials show the greatest promise for encapsulation of pesticides.

In the present study, three herbicides (metribuzin, tribenuron-methyl, and fenoxaprop-P-ethyl) were encapsulated into microparticles of two PHA types. The purpose of the study was to investigate the effects of the chemistry of the polymers and herbicides on the properties of microparticles.

Material and Methods

Microparticles were prepared from homogeneous polymer of 3-hydroxybutyric acid, P(3HB) (degree of crystallinity 75 %, melting point 176 °C, thermal decomposition temperature 287 °C, molecular weight (M_w) 590 kDa, and polydispersity index 2,2), and a copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate, P(3HB/3HV), with 12,8 mol.% 3HV (degree of crystallinity 58 %, melting point 169 °C, thermal decomposition temperature 273 °C, molecular weight (M_w) 300 kDa, and polydispersity index 2,8).

Three herbicides were investigated: metribuzin, tribenuron-methyl, and fenoxaprop-P-ethyl. The herbicides differed in their structure, physico-chemical properties, mode of action, and toxicity.

Results

Six types of microparticles were prepared using two polymer types and three herbicides. SEM images, size distribution, and characterization of the particles are given in Figures 1 and Table. The yield of P(3HB)-based microparticles was generally higher, and it varied depending on which herbicide was encapsulated. The highest yield of P(3HB)-based microparticles was produced with MET (79 %) and the lowest with FPE (63 %). The yield

of the P(3HB/3HV)/herbicide microparticles was lower: 70 % of the MET-loaded microparticles and 58 % of the FPE-loaded ones (Table). Six types of microparticles were prepared using two polymer types and three herbicides. SEM images, size distribution, and characterization of the particles are given in Fig. 1 and Table 1. The yield of P(3HB)-based microparticles was generally higher, and it varied depending on which herbicide was encapsulated. The highest yield of P(3HB)-based microparticles was produced with MET (79 %) and the lowest with FPE (63 %). The yield of the P(3HB/3HV)/herbicide microparticles was lower: 70 % of the MET-loaded microparticles and 58 % of the FPE-loaded ones. Most of the P(3HB) microparticles loaded with metribuzin and tribenuron-methyl were large-diameter spheres; particles loaded with fenoxaprop-P-ethyl formed tightly packed aggregates. Copolymer microparticles were spherical or oval in shape and smaller in size, regardless of the herbicide loaded into them. Regardless of the herbicide encapsulated in them, P(3HB)-based microparticles were larger than the copolymer ones. The average sizes of P(3HB) microparticles with MET, TBM, and FPE loaded into them were $0,75 \pm 0,11$, $0,60 \pm 0,06$, and $0,64 \pm 0,05$ μm , respectively. The average sizes of the copolymer microparticles were smaller, from $0,43 \pm 0,12$ to $0,55 \pm 0,05$ μm .

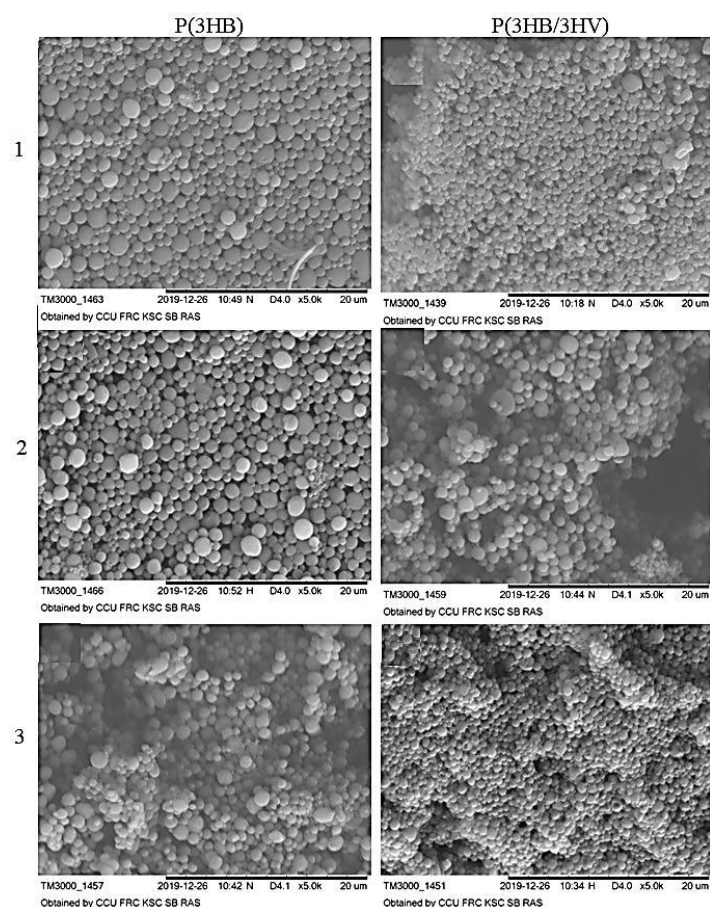


Fig. 1. SEM images of P(3HB) and P(3HB/3HV) microparticles loaded with herbicides:
 1 – metribuzin, 2 – tribenuron-methyl, and 3 – fenoxaprop-P-ethyl

Table 1

Characterization of P(3HB) and P(3HB/3HV) microparticles loaded
 with different herbicides

Microparticle composition	Yield of microparticles (Y), %	Average diameter, microns	Zeta potential, mV	Encapsulation efficiency (EE), %
P(3HB)/MET	79 ± 1,2	0,75 ± 0,11	-12	44,3 ± 2,5
P(3HB/3HV)/MET	70 ± 2,4	0,55 ± 0,05	-16	48,2 ± 1,7
P(3HB)/TBM	71 ± 2,5	0,60 ± 0,06	-11	36,5 ± 2,2
P(3HB/3HV)/TBM	69 ± 1,9	0,53 ± 0,07	-7	39,3 ± 2,5
P(3HB)/FPE	63 ± 2,6	0,64 ± 0,05	-10	24,7 ± 3,3
P(3HB/3HV)/FPE	58 ± 1,5	0,43 ± 0,12	-6	29,2 ± 2,8

Microparticles varied in size considerably. However, the P(3HB)-based microparticles loaded with MET and TBM were mostly represented by large particles (0,6-0,9 nm) while most of the copolymer particles were smaller. Zeta potential of the microparticles varied between -6 and -16 mV, regardless of the microparticle composition. The lowest values were determined for the particles of both PHA types loaded with MET (12-16 mV) and the highest – for the copolymer particles loaded with TBM and FPE. A major parameter of carriers of drugs, bioactive compounds, or pesticides is encapsulation efficiency, which determines their efficacy. Values of herbicide encapsulation efficiency (EE, %) in polymer matrices are listed in Table. The parameter varied rather widely, from 24,7 to 48,2 %. The highest values were determined for the P(3HB) and P(3HB/3HV) microparticles loaded with metribuzin (44,3 % and 48,2 %, respectively), and the lowest values (24,3 % and 28,2 %) – for the particles loaded with fenoxaprop-P-ethyl. A possible reason for the low fenoxaprop-P-ethyl encapsulation efficiency is that solubility of this herbicide is the lowest of the three herbicides used in this study (0,7 mg/L).

The herbicides used in the present study had different water solubility. The curves of release from P(3HB) and P(3HB/3HV) microparticles show that all herbicides were released gradually, and a plateau had been reached by Day 14 of the experiment in all treatments (Fig 2). By that time, metribuzin release reached 0,0008 g/L from P(3HB/3HV) microparticles and 0,0006 g/L from P(3HB) particles: 78 % and 64 % of the encapsulated herbicide (0,0010 g/L and 0,0009 g/L). That could be attributed to good water solubility of this herbicide (2040 mg/L). Previous studies on metribuzin release from P(3HB) microparticles, films, microgranules, and pellets showed that passive release of metribuzin to water mainly occurred at Days 12-14; kinetic constant K was the highest for microparticles (0,081 h⁻¹) and the lowest for films and 3D forms (0,01 h⁻¹). Water solubility of tribenuron-methyl (0,05 to 2,04 mg/L at different pH) is considerably lower than that of metribuzin. Tribenuron-methyl release

to water over 30 days was 0,0004 g/L from P(3HB/3HV) microparticles and 0,0003 g/L from P(3HB) particles: 56 and 44% of the encapsulated herbicide. Tribenuron-methyl is a pH-dependent herbicide, which shows better solubility in weakly alkaline media.

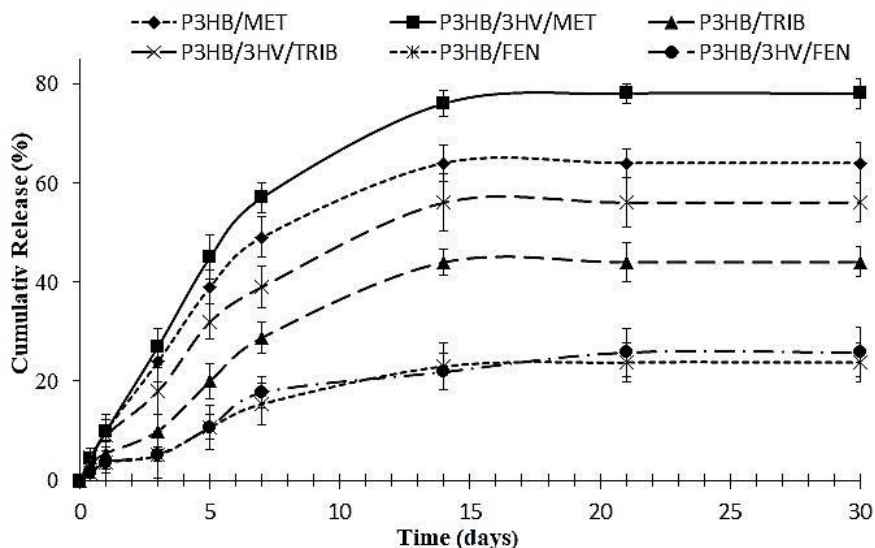


Fig. 2. Herbicide release from P(3HB) and P(3HB/3HV) polymer microparticles

FPE release from microparticles over 14 days reached 15 and 17 % of the amounts encapsulated in P(3HB/3HV) and P(3HB) particles, respectively. At Day 30, the amounts of the herbicide released to water increased to 25,8 % and 24,0 % of the encapsulated amounts, i.e. the released amounts were comparable. The low water solubility of FPE (0,07 mg/L) is the reason for the low encapsulation of the herbicide (24 and 29 %) and the small amounts released from microparticles.

Conclusion

In the present study, the metribuzin, tribenuron-methyl, and fenoxaprop-P-ethyl herbicides, which differed in their chemical structure, solubility, and mode of action, were encapsulated in polymer microparticles of degradable natural polymers – polyhydroxyalkanoates (PHAs), which had different chemical compositions and degrees of crystallinity. Good-quality microparticles were produced, and the effects of the chemical compositions of PHAs and herbicides on the properties of microparticles were investigated. The microparticle yield and the sizes of microparticles were chiefly determined by the polymer type (the high-crystallinity P(3HB) or the P(3HB/3HV) copolymer with lower crystallinity). However, herbicide encapsulation efficiency and release to water were determined by the herbicide type, and the highest parameters were obtained for the readily soluble metribuzin.

ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДОВ НА ПРОДУКЦИЮ ПОГРАНИЧНЫХ КЛЕТОК И АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В КОРНЕВОМ АПЕКСЕ ПРОРОСТКОВ *TRITICUM AESTIVUM**

С. А. Пятина, Н. Г. Мензянова, Е. И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Фитопатогенные грибы наносят огромный ущерб мировому сельскому хозяйству: они снижают не только урожаи зерновых культур, но и качество зерна вследствие контаминации микотоксинами. Фузариоз, возбудителями которого являются грибы рода *Fusarium*, – одно из самых распространенных заболеваний зерновых агрокультур [1]. Использование фунгицидов позволяет снизить риск развития фузариозов и уменьшить содержание микотоксинов в товарном зерне.

Снижение эффективности использования фунгицидов обусловлено их фитотоксичностью [2]. Фитотоксичность фунгицидов в зависимости от особенностей их химической структуры реализуется в ингибировании окислительного фосфорилирования, нарушениях стерол-зависимого сигналинга, индукции окислительного стресса, что приводит к изменению активности процессов пролиферации и дифференцировки, и в результате, к нарушениям развития и роста корневой системы, снижению ее адаптивного потенциала [3].

Адаптивный потенциал корневой системы в значительной степени зависит от пограничных клеток (ПК), впервые описанных в [4]. Специфическая популяция ПК, локализованная на поверхности корневого апекса, определяет устойчивость растения к различным неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам (патогенам, водному дефициту, индустриальным поллютантам, фитотоксикантам. ПК характеризуются высоким уровнем экскреторной активности и формируют подобную сети структуру, называемую «корневая экстраклеточная ловушка» ("Root Extracellular Trap") (RET), которая снижает активность проникновения в корневой апекс фитотоксикантов и фитопатогенов [6]. Это позволяет предполагать, что оценка численности популяции ПК и экскреторная активность ПК может быть полезна для прогнозирования дозо-зависимой устойчивости растения к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам.

Цель работы – изучение дозо-зависимого влияния фунгицидов с различным механизмом действия в корневом апексе нетаргетного вида *Triticum aestivum* в гидропонной культуре.

© Пятина С. А., Мензянова Н. Г., Шишацкая Е. И., 2021

* Работа выполнена в рамках мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» (Соглашение № 074-02-2018-328) по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь.

Материалы и методы

Изучены пестициды: тебуконазол (ТЕБ) и эпоксиконазол (ЭПО) (триазольные ингибиторы C_{14} -диметилазы); азоксистробин (АЗО), (класс стробилуринов, ингибитор митохондриального дыхания). Для оценки эффективности системы «ПК-RET» изучали активность окислительного стресса (содержание МДА, карбонилированных белков, пролина) в корнях проростков при культивировании на средах с различными концентрациями фунгицидов.

Результаты

В гидропонной культуре проростков пшеницы на средах с фунгицидами (0,01; 0,10 и 1,00 мкг/мл) было выявлено дозо-зависимое ингибирование роста корня и увеличение численности корней с признаками деструкции корневого апекса. АЗО и ЭПО (1,00 мкг/мл) индуцировали окислительный стресс: в корневых апексах увеличивалось содержание МДА и карбонилированных белков. ТЕБ не обладал прооксидантной активностью.

Исследованные фунгициды оказывали дозо-зависимое влияние на структурно-функциональный статус популяции пограничных клеток (ПК) корневого апекса: численность ПК, характер их отделения от поверхности апекса (одиночные клетки или клеточные пласты и цепочки), активность экскреции (содержание белка в гелевом чехле апекса). Дозо-зависимые эффекты значительно варьировали для каждого фунгицида. Была выявлена прямая корреляция между активностью свободно радикальных процессов (содержание МДА и карбонилированных белков в корневом апексе) и численностью ВС и их экскреторной активностью (содержание белка в гелевом чехле апекса) (для концентрации 1,00 мкг/мл).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что система ПК корневого апекса является эффекторной мишенью фунгицидов. Фунгициды уменьшают защитную эффективность системы «ПК-RET», что может снижать устойчивость корневого апекса к инвазии патогенов, а также к различным неблагоприятным абиотическим факторам. Это определяет необходимость тщательного мониторинга фунгицидов в окружающей среде.

Список литературы

1. Binder, E. M., et al. (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol.* 137: 265–282.
2. Yang, D. et al. (2014) Microencapsulation of seed-coating tebuconazole and its effects on physiology and biochemistry of maize seedlings. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 114: 241–246.
3. Serra, A. A. et al. (2013) Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 64: 2753–2766.
4. Hawes, M. C. (1992) Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. *Adv. Plant Pathol.* 8:119–148.

5. Hawes, M. C. et al. (2016). Extracellular trapping of soil contaminants by root border cells: new insights into plant defense. *Agronomy*. 6(1): 1–9.

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА RS9904341(G/C) ПРОМОТОРА СУРВИВИНА У ПАЦИЕНТОВ С РМП БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ *

Н. С. Панамарев¹, Е. Е. Башмакова²,
А. Н. Кудрявцев², Л. А. Франк^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79
²Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50;
e-mail: panamarev-n@yandex.ru

Сурвивин – наименьший белок в группе белков-ингибиторов апоптоза, который также принимает участие в регулировании деления клеток и способствует ангиогенезу. Нарушение экспрессии сурвивина способствует онкогенезу, его сверхэкспрессия наблюдается практически во всех злокачественных опухолях человека [1].

В промоторном участке гена BIRC5, кодирующего сурвивин, было выявлено несколько однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут влиять на уровень экспрессии белка. Наиболее изученным является полиморфизм rs9904341(G/C), мутация в котором коррелирует с повышенным уровнем экспрессии сурвивина. Данный SNP может использоваться как генетический маркер предрасположенности развития рака и рецидивов [2].

Цель работы – генотипирование однонуклеотидного полиморфизма rs9904341(G/C) в промоторе гена сурвивина биоломинесцентным методом у людей, больных раком мочевого пузыря.

Материалы и методы

Выявление полиморфизма осуществляли при помощи метода «PEB-Биолюм», разработанного в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН [3]. Данный метод включает следующие шаги (рис. 1): 1) амплификацию фрагмента гена, содержащего исследуемый полиморфизм; 2) реакцию удлинения аллель-специфичных праймеров (PEXT-реакция), которые несут на 5'-конце якорную группу: FAM – карбоксифлуоресцин – для праймера комплементарному аллели G, и A27 – олигоаденилат – для праймера комплементарному аллели C; 3) биоломинесцентный анализ продуктов PEXT-реакции на основе цветных вариантов Ca²⁺-регулируемого фотопротеина обелина в качестве репортеров. Определение генотипа осуществляли при помощи дискриминационного фактора Д, равного соотношению биоломинесцентных сигналов репортёров, связанных с соответствующими аллелями гена.

© Панамарев Н. С., Башмакова Е. Е., Кудрявцев А. Н., Франк Л. А., 2021

* Исследования поддержаны Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности, проект № 241 от 28.04.2021 г.

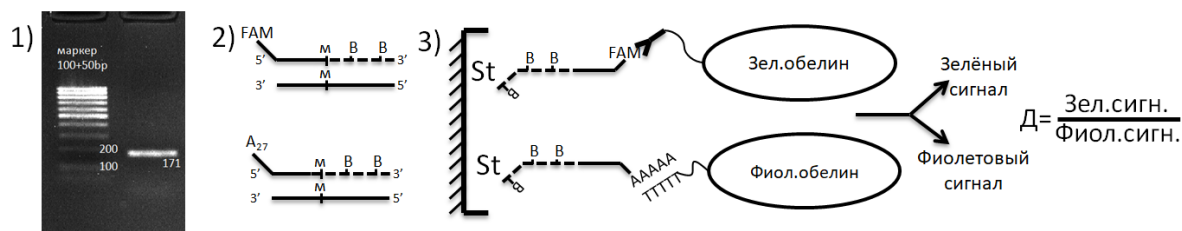


Рис. 1. Схема билюминесцентного способа выявления SNP

Полученное значение D -фактора для разных вариантов генотипа отличалось практически на порядок, что говорит о достоверности полученных результатов. Также было проведено контрольное секвенирование для подтверждения результатов (рис. 2).

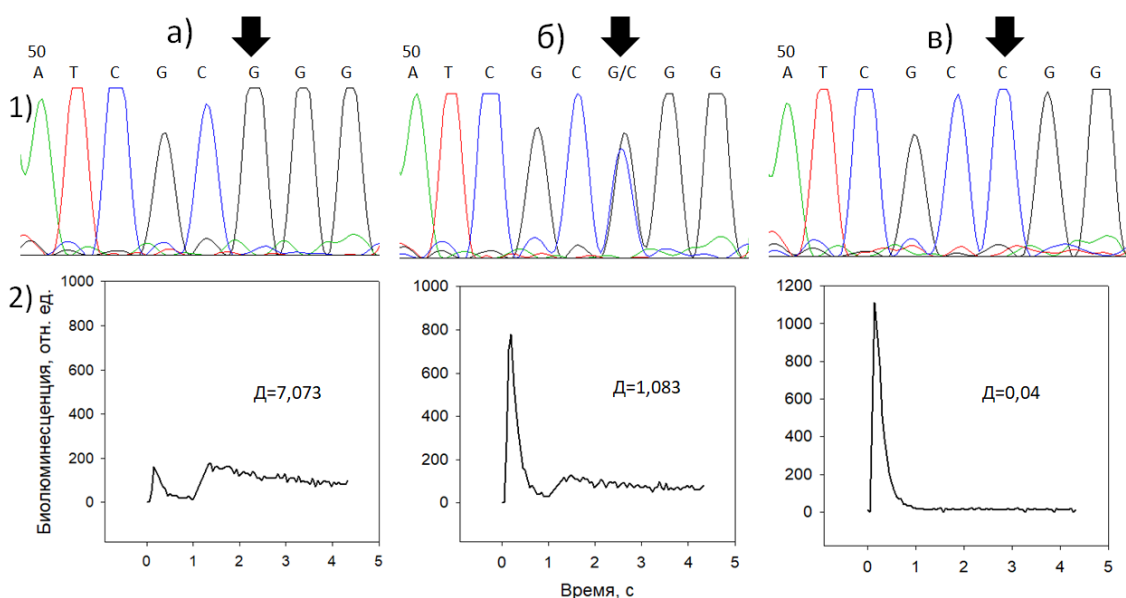


Рис. 2. Секвенограммы с контрольным секвенированием (1) и кинетикой билюминесцентного сигнала при проведении анализа (2):
 а – гомозигота GG, б – гетерозигота GC, в – гомозигота CC

Результаты

Полиморфизм гена *VIRC5* определяли в 160 образцах ДНК от пациентов с подтвержденным диагнозом рака мочевого пузыря, зарегистрированных в канцер-регистре Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А. И. Крыжановского. Контрольные образцы (всего 153) были получены от Красноярского краевого центра крови № 1. При анализе распределения генотипов исследуемой мутации была выявлена заметная зависимость – генотипы CC и CG реже встречаются среди онкобольных (см. табл. 1).

Таблица 1

Частота генотипов в экспериментальной и контрольной группах

Экспериментальная группа, N = 160		Контрольная группа, N = 153		ОШ (95 % ДИ)	
Генотип	N (%)	Генотип	N (%)	CC/GC vs GG	0.57 (0,36–0,90)
GG	76 (48)	GG	52 (34)		
GC	66 (41)	GC	72 (47)		
CC	18 (11)	CC	29 (19)		

Заключение

При сравнении групп была выявлена статистически значимая зависимость – количество носителей аллеля С было достоверно меньше в экспериментальной группе: 52 % vs 66 %, $p=0,02$ (тест хи-квадрат). Риск развития рака мочевого пузыря у них почти в 2 раза меньше по сравнению с GG генотипом: CC/GC vs GG – ОШ 0,57, 95 % ДИ = 0,36–0,90. Для изучения обнаруженной взаимосвязи необходимо проведение дополнительных исследований с увеличенным составом групп.

Список литературы

1. Jaiswal P. K., Goel A., Mittal R. D. Survivin: A molecular biomarker in cancer // Indian J. Med. Res. 2015. V. 141(4), P. 389–397.
2. Wang X, Huang L, Xu Y, Shi Z, Wang Y, Zhang J, Wang X, Cao L, Luo H, Chen J, Liu N, Yin Y, You Y. Association between survivin -31G > C promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis // Eur J Hum Genet – 2012. V. 20(7), P.790–795.
3. Bashmakova E. E., Krasitskaya V. V., Bondar A. A., Eremina E. N., Slepov E. V., Zukov R. A., Frank L. A. Bioluminescent SNP genotyping technique: Development and application for detection of melanocortin 1 receptor gene polymorphisms // Talanta. 2018. V. 189, P.111–115.

СИСТЕМА ЧАСТИЦА-КЛЕТКА НА ОСНОВЕ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Г. А. Рыльцева¹, А. В. Владимирова²

¹Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

²Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск,
пр. Свободный, 79; e-mail: Aleksa-vladimirova@yandex.ru

В тканевой инженерии полимерные биоразрушаемые микрочастицы (МЧ) являются уникальной основой для создания трехмерного каркаса для клеток *in situ*. Преимуществом таких систем является большая суммарная площадь контактной тканям поверхности, bio-interface, и сквозная открытая пористость, формирующаяся при кластеризации частиц в зоне тканевого дефекта. При этом возможно включение в состав таких МЧ различных компонентов, стимулирующих и/или направляющих клеточные реакции, в том числе стимуляторов роста и размножения, а также противовоспалительных, антибактериальных и других препаратов. Использование систем частицы-клетки особенно эффективно для выполнения дефектов мягких тканей, включая кожные покровы и подлежащие ткани [1]. Для своевременной и полноценной регенерации кожи также важным фактором является эффективное предотвращение инфицирования повреждений, что способствует активному новообразованию ткани. Хорошо зарекомендовавшими себя препаратами для кожных повреждений являются антисептики [2].

Для материалов в МЧ-системах сохраняются 5 основных требований, предъявляемых к биоматериалам в биоинженерии тканей: биосовместимость, поддержание клеточного роста, обеспечение диффузии питательных веществ и продуктов метаболизма клеток, и биоразрушаемость [1]. Практически уникальным материалом, удовлетворяющим всем этим требованиям, являются бактериальные полигидроксиалканоаты (ПГА).

Цель исследования – создание системы в виде микрочастиц из короткоцепочечного ПГА – поли(3-гидроксибутирата) (ПЗГБ) с включением антисептика бриллиантового зеленого, БЗ, для использования при повреждениях кожи, и изучение ее биологических характеристик по отношению к модельной адгезионной культуре эукариот.

Материалы и методы

В работе использован ПЗГБ с $M_w=1\ 200$ кДа, синтезированный в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ. В качестве антисептического агента использовали официальный препарат БЗ (ПФК «Обновление»). Микрочастицы получали эмульсионным методом, из 2%-раствора П(ЗГБ), с включением БЗ в состав ПЗГБ-матрицы из водной фазы.

Проведен анализ характеристик полученных микрочастиц: электрокинетический потенциал (ζ -потенциал), на Zetasizer Nano ZS, включение БЗ в П(ЗГБ)-матрикс, спектрофотометрически, по разнице исходной и остаточной концентрации БЗ в эмульсии при длине волны 625 нм на Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, США), а также характер выхода БЗ из МЧ *in vitro*, в среде сбалансированного фосфатно-солевого буфера, при $T=37,7$ °C и $pH=7,4$ в течение двадцати пяти дней. Проведена оценка характера адгезии клеток HeLa к поверхности МЧ и частиц с БЗ, МЧБЗ, и уровня апоптоза. Экспериментальная МЧ-HeLa-система получена с использованием модельной культуры клеток HeLa, при плотности засева 2×10^4 клеток на лунку, при непосредственном контакте с МЧ и МЧБЗ, 20 ± 4 мг на лунку. Для увеличения поверхности контактирования МЧ/клетки культивирование проводили в условиях перемешивания, при постоянном осевом вращении культуральных планшетов с использованием орбитального шейкера Celltron (Infors-NT, Швейцария), в CO_2 -инкубаторе при 37 °C и 5 % CO_2 . Использована среда DMEM (Gibco) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone) и 1 % антибиотика/антимикотика (Sigma). МЧ предварительно стерилизовали краткосрочным погружением в 96 % раствор этилового спирта, с последующим УФ-облучением в течение 2 часов.

Адгезию модельной культуры к поверхности МЧ и МЧБЗ оценивали при стандартном окрашивании DAPI, 4,6-диамидино-2-фенилиндолом. Клетки визуализировали в суспензии частиц в капле PBS, на Leica CRT-6 000. Метаболическую активность клеток оценивали с помощью калориметрического МТТ-теста (Sigma). Культивирование проводили в стандартных условиях в течение 72 часов в 96-луночной планшете (TPP, Швейцария), после чего МЧ с прикрепленными клетками переносили в другой культуральный планшет для проведения МТТ-теста, чтобы исключить вклад клеток со дна и стенок лунок, не прикрепленных к МЧ. На основании значений экстинкции рассчитывали процент жизнеспособности клеток на МЧ без БЗ, по сравнению с клетками, культивируемыми на полистироле (контроль, 100 %). Также, в среду с клетками добавляли БЗ в свободном виде (в водном растворе), в разведении, соответствующем расчетной концентрации БЗ в среде при внесении МЧБЗ. Для определения процентного соотношения клеток на различных стадиях апоптоза использовали проточную цитометрию CytoFlex 5, данные анализировали с использованием программного обеспечения CytExpert версии 2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc., США). Процент апоптотических клеток, прикрепленных к МЧ, оценивали с использованием двойного окрашивания FITC-аннексином V и йодидом пропидия.

Результаты

Все МЧ имели правильную сферическую форму и средний диаметр $50 \pm 1,5$ мкм. Включение БЗ составило 95 % от использованного, включение БЗ относительно 1 мг частиц составило 0,095 мг, т. е. 1 %, ζ -потенциал

МЧ – $-19,20 \pm 0,95$ mV, ζ -потенциал МЧБЗ составил $-27,3$ mV, высвобождение БЗ из частиц составило 35% за 25 дней.

Морфологический анализ системы МЧ-HeLa с использованием флуоресцентного окрашивания подтвердил адгезию модельной культуры к поверхности МЧ и МЧБЗ (рис. 1). Клетки, адгезированные к поверхности МЧ, были хорошо распластаны. На МЧ, нагруженных БЗ, наблюдалось значительное меньшее количество прикрепленных клеток.

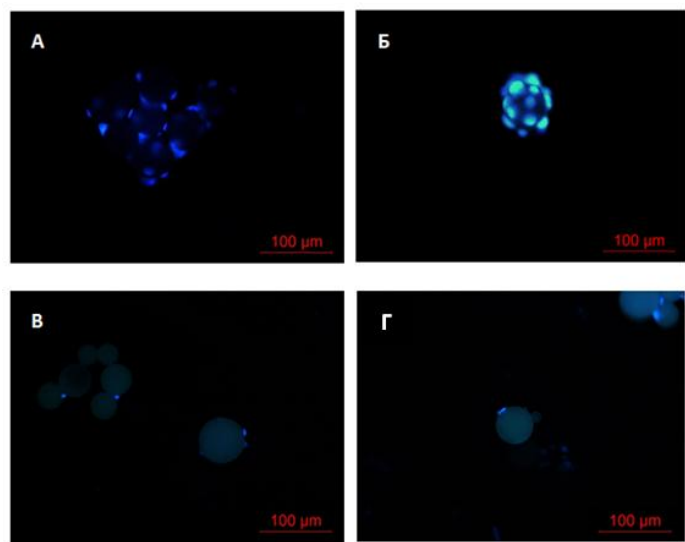


Рис. 1. Морфологический анализ экспериментальных систем частица-клетка.
Системы: А, Б – МЧ; В, Г – МЧБЗ

МТТ-тест показал относительно низкую метаболическую активность клеток в варианте с БЗ. В лунках с внесением свободного БЗ, отмечена полная гибель клеток через сутки, в то время как в лунках с МЧБЗ отмечено меньшее, но также выраженное цитотоксическое действие депонированного БЗ (рис. 2).

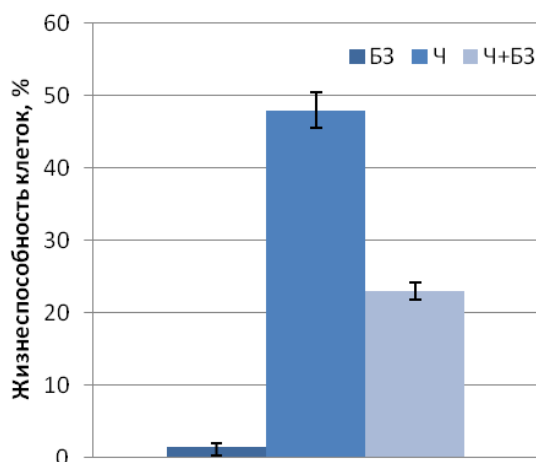


Рис. 2. Жизнеспособность клеток, культивируемых с различными системами:
БЗ – бриллиантовый зеленый; Ч – МЧ; Ч+БЗ – МЧ, нагруженные БЗ

Проточный цитометрический анализ с использованием аннексина V показал, что МЧБЗ в условиях динамического культивирования индуцируют поздний апоптоз в клетках. При депонировании БЗ в ПЗГБ-матрицу процент клеток, находящихся в раннем апоптозе, значительно возрастает (рис. 3).

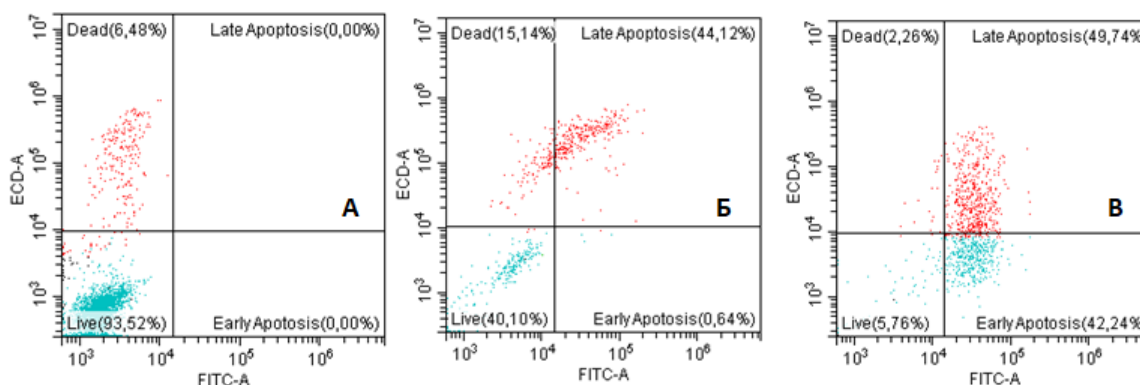


Рис. 3. Влияние МЧ на индукцию апоптоза клеток:
А – культуральный пластик; Б – МЧ; В – МЧ, нагруженные БЗ

Заключение

Получены первые результаты по адгезии модельной культуры на поверхность микрочастиц из ПГА – ПЗГБ. Установлено, что присутствие в частицах бриллиантовой зелени снижает клеточную адгезию, а также жизнеспособность клеток, за счет проявлений апоптоза. В целом, в эксперименте получены удовлетворительные показатели по морфологии частиц, эффективности депонирования и высвобождения БЗ в модельной среде, а также достаточная стабильность МЧ и МЧБЗ *in vitro*.

Список литературы

1. Williams S., Martin D., Horowitz D., Peoples O. (1999) PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Biological Macromolecules*. V. 25, p. 111–121.
2. Saghazadeh S., Rinoldi C., Schot M. et al. (2018) Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 127, p. 138–166.

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЕРБИЦИДНЫХ И ФУНГИЦИДНЫХ ПЕСТИЦИДОВ НА СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ИЗ *TRITICUM AESTIVUM* *

Н. Г. Мензянова, С. А. Пятина

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

Использование пестицидов для обработки сельскохозяйственных культур приводит к включению пестицидов в пищевые цепи, что определяет высокую опасность этих поллютантов для экосистемы в целом, а также для здоровья человека. Пестициды обладают репродуктивной токсичностью, тератогенной активностью, являются эндокринными дескрипторами, снижают активность гуморального иммунитета, обладают эпигенетической активностью. Широкое использование пестицидов потенциально создает угрозу и для экономически важных сельскохозяйственных культур из-за цитологического повреждения растений и ряда побочных эффектов. Системные гербициды не только вызывают гибель растений, но также проявляют хроническое токсическое действие, оказывая разностороннее влияние на важные процессы жизнедеятельности: деление клеток, развитие тканей, образование хлорофилла, фотосинтез и дыхание. При этом из-за огромного разнообразия используемых в сельском хозяйстве пестицидов, имеющиеся в литературе сведения о генотоксичности химических средств защиты растений далеки от исчерпывающей картины. Это обуславливает актуальность исследования повреждающих свойств пестицидов.

Цель работы – исследование цито- и генотоксичности пестицидов гербицидного и фунгицидного действия с различным механизмом действия по отношению к нетаргетному высшему растению – пшенице.

Материалы и методы

Исследовали системные пестициды гербицидного и фунгицидного действия, различающиеся механизмом повреждающего действия (фунгициды эпоксиконазол, тебуконазол, азоксистробин и гербициды метрибузин, трибунурон-метил, феноксапрон). Исследования выполнены на корнях 2х-дневных проростков *Triticum aestivum*, полученных в гидропонной культуре. Маркерами цитотоксичности служил митотический индекс и анафазно-телофазные аномалии; генотоксичности – хромосомные aberrации и микроядра.

Результаты

Общей особенностью исследованных пестицидов является наличие в молекуле планарных циклических структур с системой двойных связей,

© Мензянова Н. Г., Пятина С. А., 2021

* Работа выполнена в рамках мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь.

что определяет способность пестицидов участвовать в π - π -стэкинг-взаимодействиях. Способность пестицидов участвовать в формировании стэкинг-взаимодействий предполагает их способность образовывать белковые аддукты и ДНК-аддукты, и как следствие, проявлять цито- и генотоксичность.

Внесение в культуральную среду исследованных пестицидов в концентрациях 0,01; 0,10 и 1,00 мкг/мл, не влияло на активность прорастания зерновок, но ингибировало развитие корней. Ингибирующий эффект был дозозависимым. Среди фунгицидов эффект ингибирования был выражен в большей степени для азостробина (АЗО), при действии которого абсолютно биомасса корней была в 2,5 раза ниже, чем под действием тебуконазола (ТЕБ) и эпоксиназола (ЭПОК). Параметром оценки уровня цитотоксичности различных химических агентов, включая пестициды, служит митотический индекс (МИ), характеризующийся общим числом делящихся клеток в клеточном цикле. Изученные пестициды (концентрация в среде 1,0 мкг/мл) практически не влияли на митотический индекс (МИ) меристемы корневого апекса 2-дневных проростков

Исследованные пестициды по-разному влияли на продолжительность метафазы, анофазы и активность цитокинеза (численность клеток в той или иной фазе митоза) в меристеме корневого апекса *Triticum aestivum* (рис. 1). Так, фунгицид азостробин приводил к увеличению продолжительности метафазы: количество клеток в метафазе было в 1,8 раза больше, чем в контрольном варианте. Задержка процессов деления на стадии метафазы приводило к резкому сокращению относительной численности клеток на стадии телофазы (рис. 1). Фунгицид тебуконазол уменьшал численность клеток на стадии метафазы в 1,6 раза по сравнению с контролем. Вероятно, это связано с увеличением продолжительности профазы, для которой отмечена тенденция увеличения количества клеток.

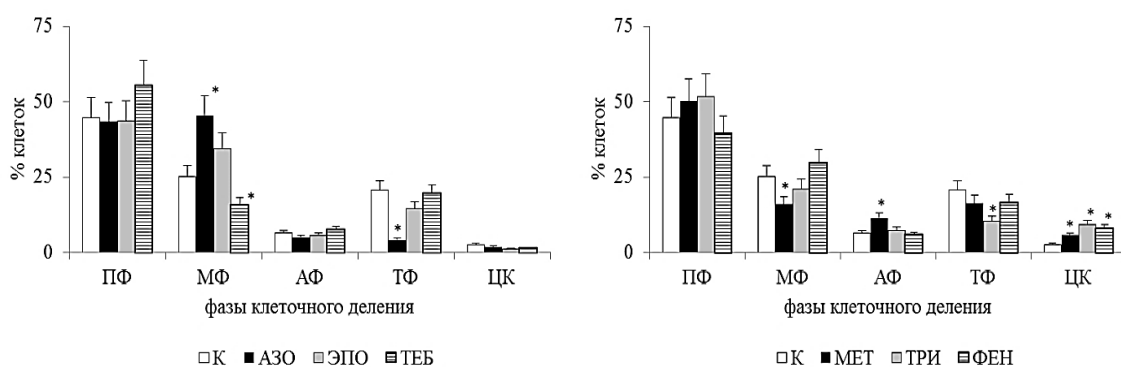


Рис. 1. Относительная численность клеток (в %) в различных стадиях митоза в меристеме корневого апекса 2-дневных проростков *Triticum aestivum* при культивировании на средах с пестицидами; К – контроль (дистиллированная вода). ПФ – профаза, МФ – метафаза, АФ – анафаза, ТФ – телофаза, ЦК – цитокинез.
 * – означает достоверное отличие ($p \leq 0,05$)

Изученные гербициды не влияли на продолжительность профазы, количество клеток в этой фазе митоза достоверно не отличалось от контрольного варианта. Но при этом наблюдали изменения продолжительности других фаз митоза. Так, МЕТ уменьшал количество клеток в метафазе в 1,6 раза, по сравнению с контролем (рис. 1). Уменьшение продолжительности метафазы сопровождалось увеличением численности клеток на стадии анафазы (в 1,8 раза) и цитокинеза (в 2 раза), по сравнению с контролем. Характерной особенностью гербицидов (в отличие от фунгицидов) было увеличение численности клеток на стадии цитокинеза (стадия с не полностью оформленной промежуточной пластинкой, новой клеточной стенкой между двумя дочерними клетками) (рис. 1). Для МЕТ, ТРИ и ФЕН количество клеток на стадии цитокинеза было в 2,0; 3,4 и 3 раза, соответственно, больше, чем в контроле. Увеличение продолжительности цитокинеза может быть связано с индуцированными гербицидами нарушениями биогенеза клеточной стенки. Влияние пестицидов на продолжительность различных фаз митоза может быть обусловлено эпигенетической активностью пестицидов.

Для всех исследованных пестицидов по отношению к нетаргетному растению *Triticum aestivum* обнаружено проявление цито- и генотоксичности, включающей как кластогенные, так и анеугенные эффекты. Под действием пестицидов в меристематических клетках выявлены структурные аномалии, обусловленные разрывами хромосом (мосты, фрагменты, микроядра) и повреждением веретена деления (отстающие хромосомы и их фрагменты, неравномерное расхождение хромосом) (рис. 2). Под действием всех пестицидов значительно возросло количество аномальных клеток, в наибольшей степени (в 10–12 раз по сравнению с контролем – дистиллированная вода) под действием гербицидов ТРИБ и ФЕН и фунгицидов АЗО и ЭПОК; в меньшей – под действием МЕТ и ТЕБ (в 6–7 раз).

Для ТЕБ общее количество клеток с аномалиями было почти в 2 раза меньше, чем для АЗО и ЭПО. В экспериментальных вариантах с АЗО и ЭПО численность клеток с анафазно-телофазными аномалиями (6,98 % и 5,75 % соответственно) была значительно выше, чем для ТЕБ (1,92 %). Это позволяет говорить, о более выраженных эффектах азостробина и эпоксилона. Цитотоксичность этих двух фунгицидов в основном реализовалась в индукции слипания хромосом. Клетки с микроядрами выявлены в меристеме корневого апекса только при культивировании на среде с эпоксилоном. Наибольшее количество клеток с хромосомными аберрациями зафиксировано под действием тебуконазола. Это позволяет заключить, что генотоксичная активность тебуконазола и эпоксилона для клеток меристемы пшеницы выше, чем азостробина.

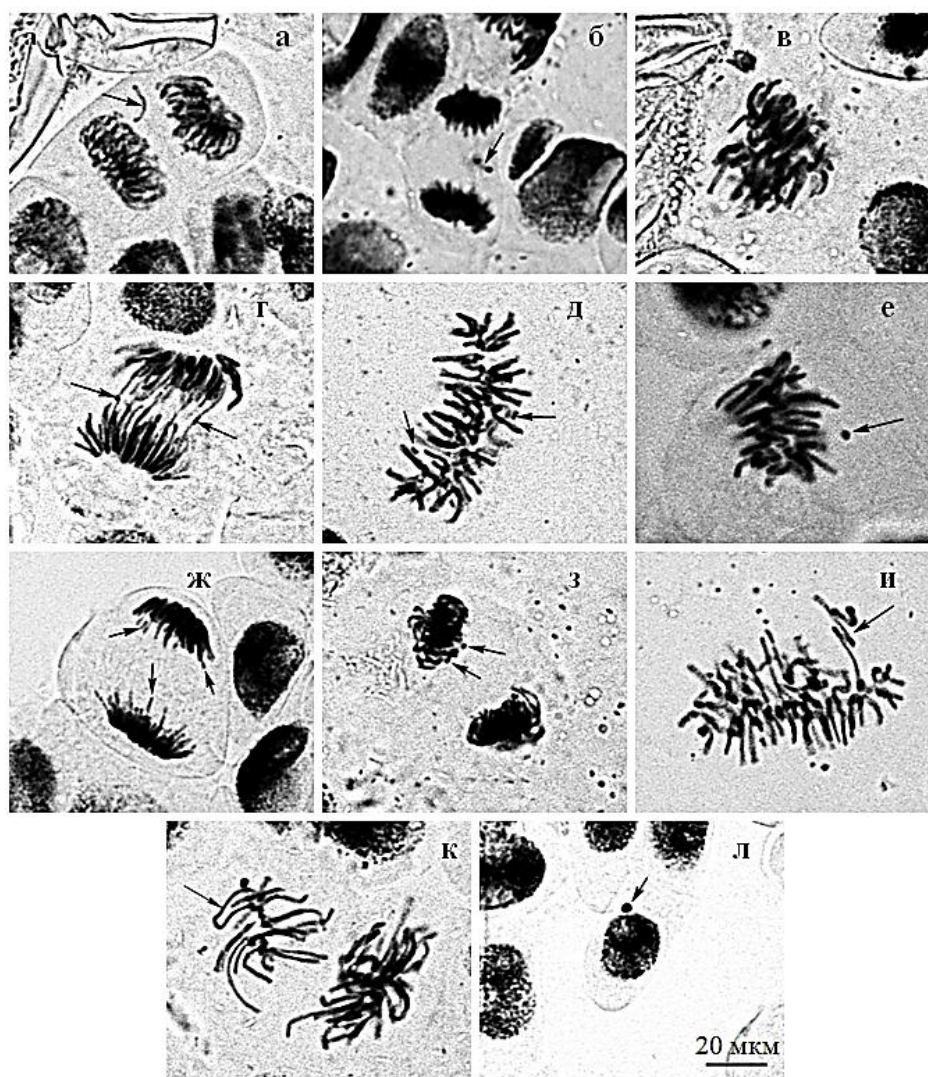


Рис. 2. Анафазно-телофазные аномалии, хромосомные aberrации и микроядра в клетках меристемы 2х-дневных проростков *Triticum aestivum*: а, б – отстающие хромосомы в телофазе; в – слипание хромосом; г – хромосомные мосты в анафазе; д и к – хромосомные aberrации: д – одиночные хромосомные фрагменты, сохраняющие связь с хроматидами; е – свободный одиночный хромосомный фрагмент в метафазе; ж – одиночные хромосомные фрагменты в анафазе; з – одиночные хромосомные фрагменты в телофазе; и – дицентрическая хромосома; к – кольцевая хромосома; л – микроядро

Заклучение

Исследованные пестицидные препараты проявляли дозозависимый ингибирующий эффект на развитие корней *Triticum aestivum*, оказывали влияние на продолжительность метафазы, анафазы, профазы и активность цитокинеза в меристеме корневого апекса пшеницы. Все пестициды увеличивали количество аномальных клеток и независимо от механизма повреждающего действия, вызывали кластогенные и анеугенные эффекты.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АВТОХТОННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ КАРТОФЕЛЯ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В РЕГИОНАХ СИБИРИ *

С. В. Прудникова¹, А. А. Чураков²,
С. В. Овсянкина², С. В. Хижняк²

¹Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

²Красноярский государственный аграрный университет, Россия, 660049, Красноярск,
пр. Мира, 90

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных культур. В РФ под посадками картофеля заняты огромные площади; основные районы выращивания: Нечерноземные и Центрально-Черноземные зоны РФ, Поволжье, Сибирь, Урал, Дальний Восток. В последние годы отмечается тревожная тенденция нестабильности и снижения урожайности картофеля в результате распространения вредителей и возбудителей болезней, причиняющих ущерб этой культуре в процессе вегетационного периода, а также длительного хранения. Потери урожая картофеля могут составлять от 13 до 30% [1]. Кроме того, некоторые виды грибов (*Alternaria*, *Fusarium*) продуцируют микотоксины. Это актуализирует исследования, направленные на выделение и идентификацию возбудителей болезней картофеля, характерных для конкретных сельскохозяйственных регионов, для выбора препаратов и оптимизации технологий защиты.

Цель работы – выделение и идентификация автохтонных возбудителей болезней картофеля, распространенных в регионах Сибири.

Материалы и методы

Проведен фитосанитарный анализ агропреобразованной почвы, отобранной с полей учебно-научного комплекса «Борский» Красноярского ГАУ в конце мая 2021 г. в окрестностях г. Красноярска (средние широты Сибири) и двух сортов семенного материала картофеля «Красноярский ранний» и «Леди Клэр». Анализ почвенных проб проводили методом высева на питательные среды (агар Чапека-Докса, сусло-агар). Для выделения фитопатогенов из пораженных частей клубней вырезали фрагменты размером около 1 см и раскладывали в чашки Петри на питательную среду (сусло-агар). Культивировали в течение 5–7 суток при температуре 28 °С, затем проводили 3-х кратный пассаж изолятов на сусло-агаре для выделения чистых культур. Идентификацию выделенных возбудителей проводили на основании симптомов пораженных клубней [2], а также морфологических, культуральных и молекулярно-генетических признаков выде-

© Прудникова С. В., Чураков А. А., Овсянкина С. В., Хижняк С. В., 2021

* Работа выполнена в рамках мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь (Соглашение СФУ и Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-626).

ленных изолятов грибов [3]. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 28S рРНК выделенных грибов сравнивали с последовательностями в GenBank с помощью программы BLAST для поиска высокоомологичных последовательностей веб-ресурса Национального центра биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Филогенетический и молекулярный эволюционный анализ идентифицированных аутохтонных возбудителей болезней картофеля проведен с использованием программного пакета MEGA версии X [4].

Результаты

В ходе анализа почвенных проб и пораженных клубней картофеля было выделено в чистые культуры 18 грибных изолятов, отнесенных к следующим таксонам: *Fusarium* – 12 изолятов; *Alternaria* – 3 изолята, *Boeremia* – 2 изолята и *Rhizoctonia* – 1 изолят. Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента гена 28S рРНК показали наличие среди исследованных проб идентичных видов грибов, среди которых идентифицированы следующие виды: *Alternaria alternata*, *Alternaria longipes*, *Boeremia exigua*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium vanettenii* (рис. 1). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 28S рРНК депонированы в базе данных GenBank под номерами №№ MZ424190-MZ424198.

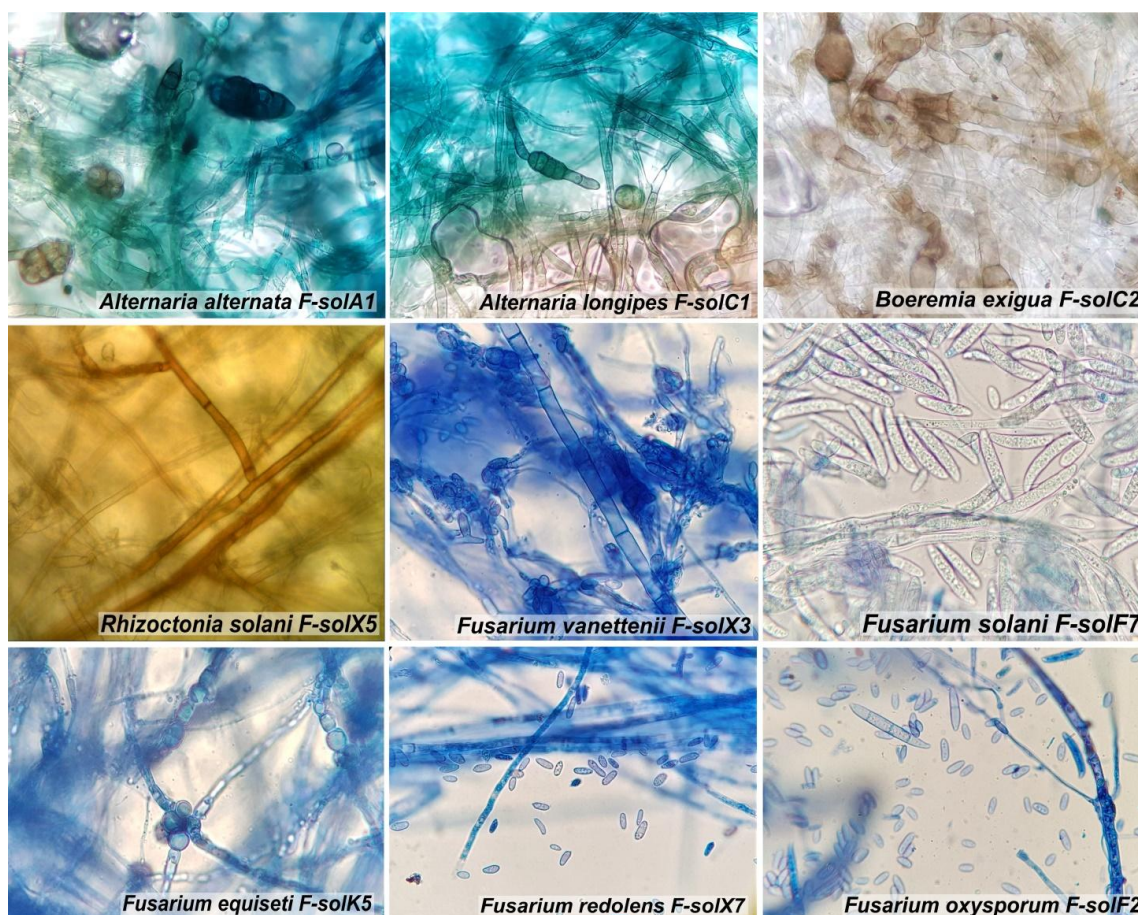


Рис. 1. Микрофотографии мицелия и конидий выделенных штаммов грибов – возбудителей заболеваний картофеля

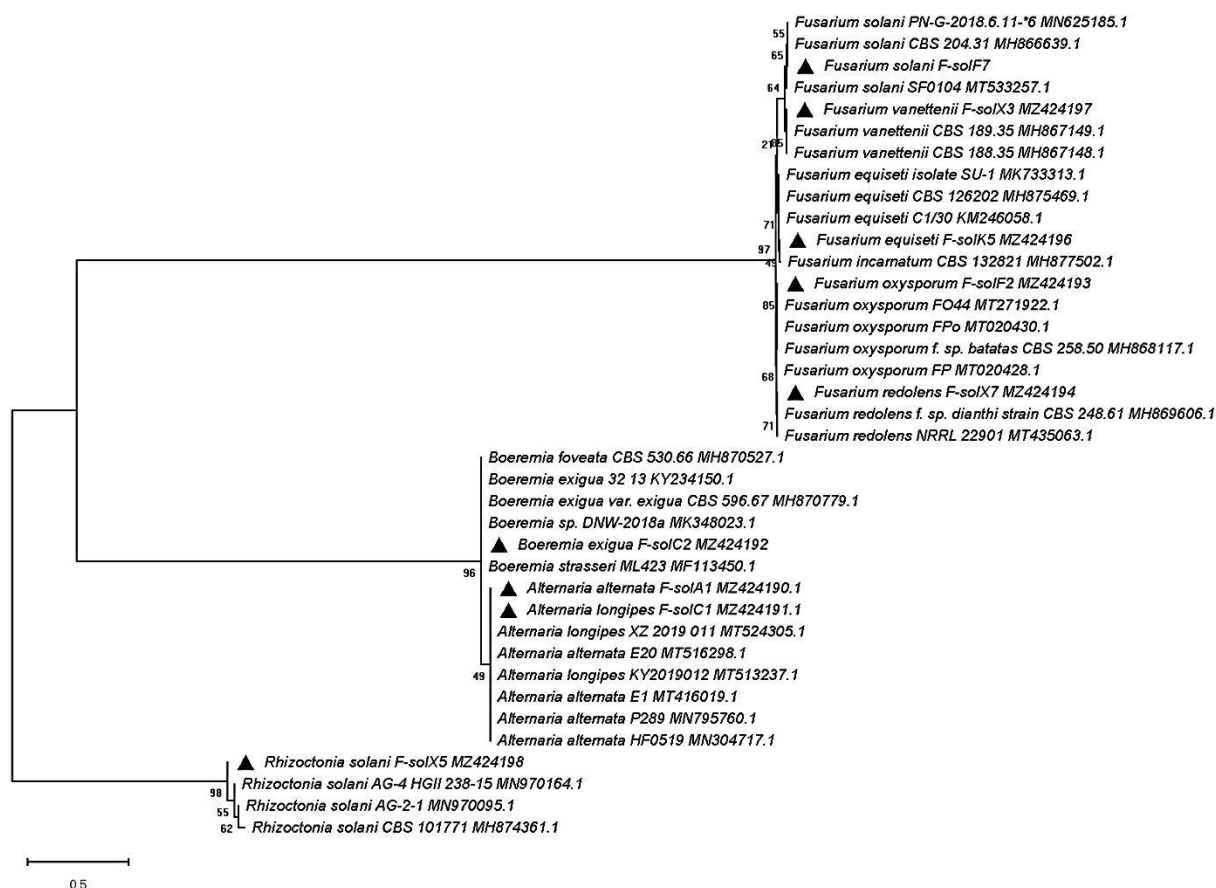


Рис. 2. Бескорневое филогенетическое древо, построенное на основе анализа последовательностей гена 28 S рРНК с использованием модели Джукса и Кантора, метод присоединения соседей. Маркером отмечены выделенные штаммы фитопатогенных грибов, распространенные на картофеле в Красноярском крае

Филогенетический анализ с использованием данных нуклеотидных последовательностей гена 28S рРНК (600 п.н.) идентифицированных штаммов и наиболее близких гомологов из GenBank показал, что штаммы формируют на дереве с максимальным уровнем «bootstrap»-поддержки три отдельных кластера. В соответствии с современными представлениями о систематике грибов, первый кластер содержит виды рода *Fusarium*, относящиеся к порядку *Hypocreales* отдела *Ascomycota*; второй кластер включает виды родов *Alternaria* и *Boeremia*, относящиеся к порядку *Pleosporales* этого же класса; третий кластер – монофилетический, содержит вид *Rhizoctonia solani*, относящийся к порядку *Cantharellales* отдела *Basidiomycota*.

В комплексе аборигенных штаммов фитопатогенных грибов в Красноярском регионе преобладали виды рода *Fusarium*, в том числе *F. oxysporum* – космополит, широко распространенный среди патогенов картофеля, как в России, так и в других странах мира. Гриб *F. oxysporum*, поражает сосудистую систему растений и вызывает сухую гниль клубней, приводя к значительным потерям при хранении картофеля, достигающим почти 2 000 ц/га [5]. Кроме того, формы вида *F. oxysporum* (*formae*

speciales) проявляют широкую специфичность и инфицируют растения, принадлежащие к разным семействам. Виды *F. equiseti*, *F. redolens* и *F. solani* также описаны среди патогенов картофеля в Иране, Алжире, Саудовской Аравии, Польше [6]. Вид *F. vanettenii* принадлежит к комплексу видов *F. solani* и помимо картофеля может вызывать заболевания томатов, моркови, люцерны, ряда бобовых культур. Возбудитель ризоктониоза *R. solani* относится к типичным видам, распространенным во всех районах картофелеводства. Вид *Boeremia exigua*, ранее *Phoma exigua*, вызывает поражение клубней картофеля при хранении (гангрена или фомозная гниль). Возбудители альтернариоза картофеля *A. alternata* и *A. longipes* также повсеместно распространены и проявляют высокую скорость распространения и вредоносность [7].

Заключение

Выделены возбудители болезней картофеля семенного материала двух сортов картофеля «Красноярский ранний» и «Леди Клэр», выращиваемых в Красноярском регионе (средняя Сибирь); на основании морфологических, культуральных признаков и молекулярно-генетического анализа фрагмента гена 28S рРНК идентифицированы: *Alternaria alternata*, *Alternaria longipes*, *Boeremia exigua*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium vanettenii*.

Список литературы

1. Бакетов П. В. Снижение потерь картофеля и овощей. – М.: Россельхозиздат, 2001.
2. Передовые методы идентификации патогенов картофеля. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019.
3. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. – М.: Мир, 2001.
4. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. – Mol. Biol. Evol. – 2018.– V. 35. – P. 1547–1549.
5. Соколова Л. М. Анализ видового разнообразия грибов из рода *Fusarium* // Аграрная наука, 2019. – Т. 1. – С. 118–122.
6. Хадиева Г. Ф. и др. Анализ микромицетов рода *Fusarium*, изолированных из инфицированных клубней картофеля, выращенных в Республике Татарстан // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 3.
7. Кузнецова М. А. и др. Фитофтороз и альтернариоз картофеля: программа защитных действий. // Картофель и овощи, 2010. – № 3. – С. 27–29.

ВОЗБУДИТЕЛИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ КАРТОФЕЛЯ, РАСПРОСТРАНЕННЫЕ В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ *

Е. М. Канцерева

*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79;
e-mail: kantserev70@mail.ru*

Россия занимает второе место в мире по площади посевов картофеля и третье – по валовым сборам. Картофель относится к числу наиболее поражаемых болезнями культур. Насчитываются 54 вида фитопатогенных грибов, которые поражают картофель. Заболевание в первую очередь связано с климатическими изменениями благоприятными для развития грибных инфекций [1]. Вследствие вегетативного размножения большинство поражающих его болезней передается через семенные клубни, которые и являются первичным источником инфекции для последующего заражения посадок [2]. Значительные потери урожая в неблагоприятные годы, а также развитие токсигенных грибов угрожает продовольственной безопасности [3]. Поскольку спектр фитопатогенов и в разных регионах может отличаться, как и их чувствительность к препаратам для защиты растений, необходимо проводить исследование распространения разных видов грибов-возбудителей болезней картофеля.

Цель работы – выделение и идентификация возбудителей грибных болезней картофеля в Красноярском крае.

Материалы и методы

Объектом исследований служили патогенные грибы, выделенные из зараженных клубней. Из поражённого участка вырезали фрагменты и раскладывали в чашки Петри на агаризованную среду Чапека-Докса или сусло-агар. Проросший мицелий отсеивали на скошенный агар. Идентификацию выделенных культур проводили по морфологическим признакам.

Результаты

Из клубней картофеля было выделено 14 изолятов мицелиальных грибов, которые на основании морфологии колоний, мицелия и спороношения были отнесены к родам *Fusarium* и *Rhizoctonia*.

Гриб *R. solani*: мицелий гриба хорошо развит, белый, беловато-желтый или светло-кремовый, соломенно-желтый (рис. 1, а). Вид способен поражать картофель на всех этапах онтогенеза. В настоящее время насчитывают несколько форм проявления ризоктониоза. Заболевание проявляется в виде черной парши, углубленной (ямчатой) пятнистости и сетчатого нек-

роза клубней, загнивания глазков и ростков, отмирания столонов и корней, а также в виде сухой гнили подземной части стебля в виде коричневых язв различной величины «трухлявая древесина» и «белой ножки» стеблей [2].

F. oxysporum и *F. solani* – наиболее распространенные возбудители болезней картофеля [4]. *F. oxysporum*: воздушный мицелий белый, хлопьевидный, обратная сторона имеет розовый оттенок; конидиеносцы короткие, макроконидии слегка изогнутые, микроконидии обильные, образуются в ложных головках на коротких фиалидах; на мицелии формируются хламидоспоры (рис. 1, б). Фузариозное увядание поражает картофель, помидоры и другие пасленовые. Листья и стебли зараженных растений теряют упругость, становятся светло-зелеными, зеленовато-желтыми, коричневыми и, наконец, разрушаются. При инфицировании клубней картофеля развивается сухая гниль. Болезнь может проявляться сразу, а может протекать в скрытой форме, что приводит к заражению семенного материала и дальнейшему распространению болезни [5].

F. solani: воздушный мицелий пушистый или пленчатый, белый, бело-розовый, кремово-желтоватый (рис. 1, в). Хламидоспоры коричневые, сферические. Микроконидии цилиндрические, 1-2-клеточные. Макроконидии веретеновидно-серповидные, эллиптически изогнутые, одинакового диаметра на большем протяжении длины конидий, со слегка суженной и тупой верхней клеткой, обычно с 3 перегородками. Симптомы заражения данным фитопатогеном не отличаются от симптомов, вызываемых *F. oxysporum*.

Fusarium vanettenii относится к группе видов *F. solani* и обладает близкими свойствами. Воздушный мицелий белый или бело-розовый, обратная сторона окрашена в розовато-сиреневый цвет; микроконидии в основном одноклеточные, эллиптические или яйцевидные (рис. 1, г). Вид *F. vanettenii* поражает корнеплоды, томаты, горох и другие виды растений.

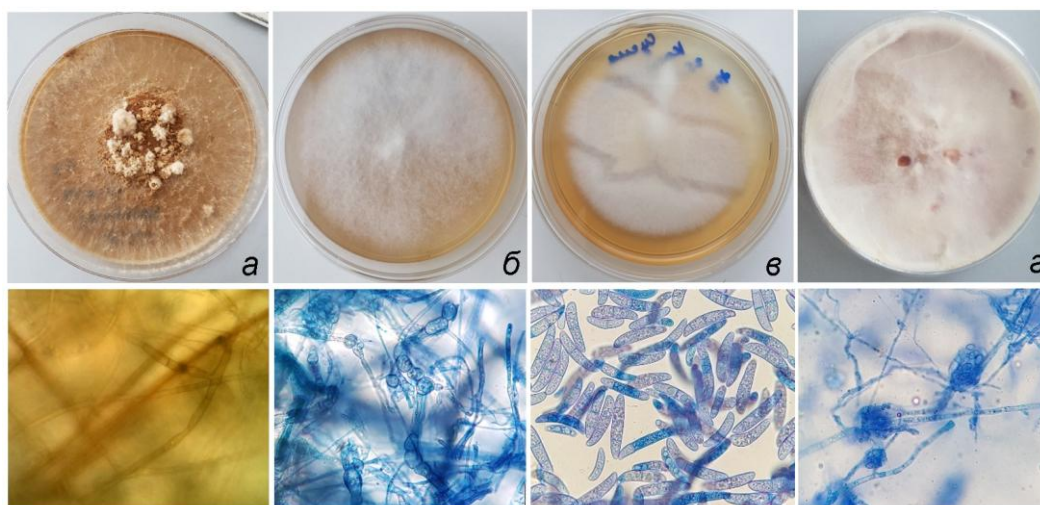


Рис. 1. Морфология колоний, мицелия и спороношения грибов, выделенных из клубней картофеля: а – *Rhizoctonia solani*, б – *Fusarium oxysporum*, в – *Fusarium solani*, г – *Fusarium vanettenii*

Заключение

Таким образом, исследование показало, что изоляты, выделенные из пораженных клубней картофеля, относятся к видам *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium vanettenii*.

Список литературы

1. Игнатов А. Н. и др. Бактериозы картофеля в Российской Федерации // Картофель и овощи. – 2018. – №. 1. – С. 3.
2. Анисимов Б. В. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – М.: Картофелевод, 2009. – 270 с.
3. Левитин М. М., Джавахия В. Г. Токсигенные грибы и проблемы продовольственной безопасности (обзор) // Достижения науки и техники АПК. – 2020. – Т. 34. – №. 12.
4. Соколова Л. М. Анализ видового разнообразия грибов из рода *Fusarium* // Аграрная наука. – 2019. – Т. 1. – С. 118–122.
5. Хадиева Г. Ф. и др. Анализ микромицетов рода *Fusarium*, изолированных из инфицированных клубней картофеля, выращенных в Республике Татарстан // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 3.

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ДЕПОНИРОВАННЫХ ФОРМ ФУНГИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* *

Д. А. Демьянчук, Е. М. Канцерева

*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79;
e-mail: demyanchuk_dasha@mail.ru*

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, по объемам производства в мире он находится на 4-м месте после пшеницы, риса и кукурузы. Грибные болезни картофеля ведут к значительным потерям при выращивании, хранении, транспортировке и реализации. Применение фунгицидов является основным методом борьбы с порчей картофеля из-за отсутствия устойчивых сортов [1, 2]. Способы применения фунгицидных препаратов – это опрыскивание почвы или предпосадочная обработка клубней. С помощью этих методов можно эффективно бороться с болезнями, передаваемыми через почву, однако значительное количество пестицидов попадет в почву, что неизбежно окажет серьезное воздействие на почву и грунтовые воды. Альтернативным методом является использование биоразлагаемой основы, содержащей фунгициды, для борьбы с фитопатогенными грибами. Биоразлагаемые материалы могут предотвращать и контролировать заболевания, передаваемые через почву, поскольку они постепенно разрушаются в почве с высвобождением активных ингредиентов [3].

Цель работы – оценка фунгицидного действия препаратов, депонированных в основу из биоразрушаемого полимера – поли(3-гидроксибутирата), и опилок, в отношении грибов – возбудителей болезней картофеля, распространенных в Красноярском крае.

Материалы и методы

В работе использовали препараты фунгицидного действия азоксистробин (АЗО), дифеноконазол (ДИФ) и комбинацию препаратов азоксистробина и мефеноксама (АЗО+МЕФ). Депонированные препараты были изготовлены в форме гранул, содержащих биоразрушаемый полимер поли(3-гидроксибутират) [П(ЗГБ)], опилки в качестве наполнителя и фунгицидный препарат в соотношении 50/40/10 (вес.%). В качестве тест-объектов были использованы штаммы грибов, выделенные из инфицированных клубней картофеля *Alternaria alternata*, *Alternaria longipes*, *Boeremia exigua*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium vanettenii*. Гриб вы-

© Демьянчук Д. А., Канцерева Е. М., 2021

* Работа выполнена в рамках проекта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь (Соглашение СФУ и Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-626).

рацивали газоном в чашках Петри на сусло-агаре, затем фрагмент мицелия размером около 5 мм засеивали в чашку Петри со стерильным сусло-агаром, а на противоположной стороне помещали одну из исследуемых форм фунгицидов, далее образцы инкубировали в течение 7–10 суток, после чего измеряли средний радиус колоний гриба. В качестве положительного контроля в чашку Петри вносили коммерческие препараты фунгицидов в количестве, аналогичном содержанию препарата в гранулах: Квадрис (азоксистробин), Юниформ (азоксистробин+мефеноксам) и Скор (дифеноконазол). В отрицательном контроле грибы выращивали без воздействия фунгицидов. Степень ингибирования роста каждым исследованным типом препарата определяли по отношению к контрольному варианту.

Результаты

Выявлено, что разные виды фитопатогенных грибов отличались по чувствительности к фунгицидным препаратам. Наиболее активно отмечено подавление видов *A. longipes*, *B. exigua*, *F. solani* и *R. solani* под действием депонированных фунгицидов азоксистробина и дифеноконазола. Так, радиус колоний *A. alternata* под действием депонированных форм уменьшался в 1,2–1,4 раза, а у вида *A. longipes* – в 1,3–1,6 раза по сравнению с негативным контролем. Высокую чувствительность проявлял возбудитель фомоза – вид *B. exigua*, радиус колоний под действием депонированных и коммерческих форм азоксистробина и дифеноконазола уменьшался в 1,5–1,8 и 2,3–2,8 раза, соответственно. *R. solani* также проявляла высокую чувствительность к гранулам с азоксистробином и дифеноконазолом, радиус уменьшался в 1,9 раза по сравнению с негативным контролем.

Рост колоний видов рода *Fusarium* под действием азоксистробина ингибировался в 1,2–1,3 раза. Виды *F. solani* и *F. equiseti* в 1,2–1,4 раза замедляли рост в присутствии гранул депонированных препаратов, действие коммерческих форм достоверно не отличалось от экспериментальных гранул. Большинство видов *Fusarium* проявляли высокую чувствительность к коммерческому препарату Скор, остальные формы препаратов обладали близкой эффективностью, вызывая задержку роста мицелия гриба в 1,2–1,5 раза.

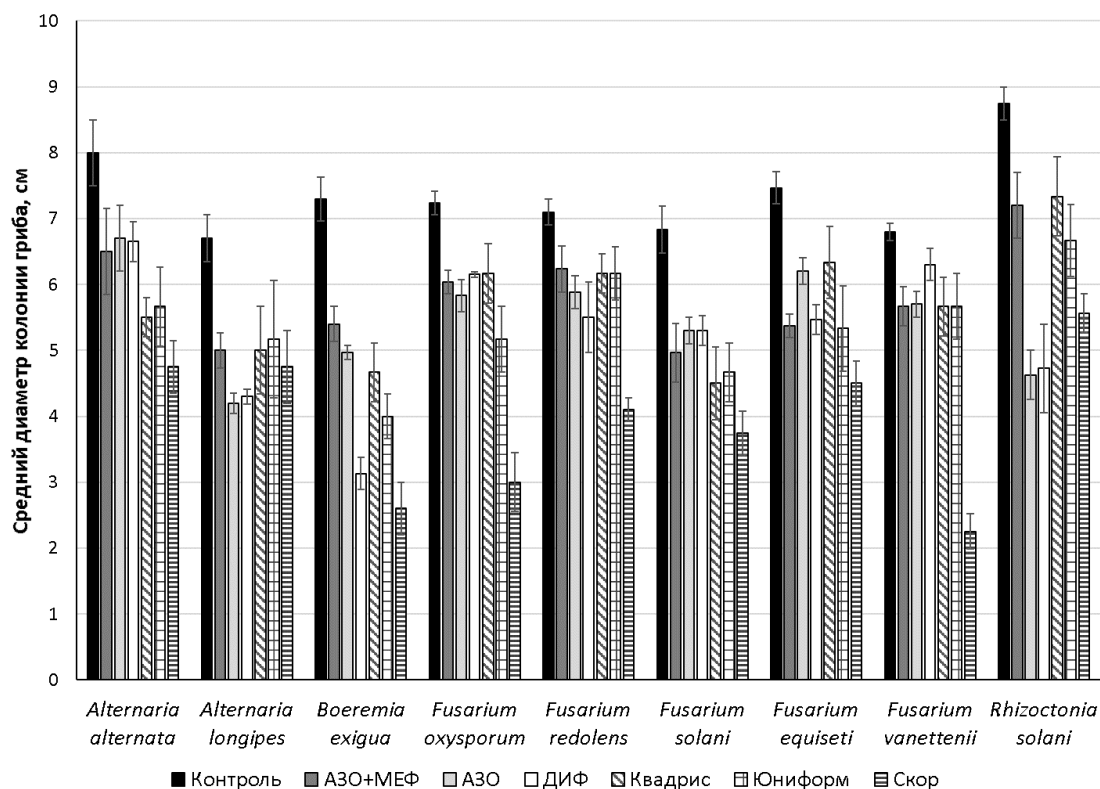


Рис. 1. Ингибирование роста колоний грибов-фитопатогенов картофеля под воздействием фунгицидных препаратов

Заключение

Все формы депонированных фунгицидов показали выраженное ингибирующее действие в отношении *A. alternata*, *A. longipes*, *B. exigua*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. vanettenii* и *R. solani*, не уступающее свободным формам данных фунгицидов в аналогичной концентрации, что проявлялось в уменьшении от 1,5 до 2,3 раза размера колоний грибов в присутствии депонированных фунгицидов по сравнению с размером колоний в положительном контроле.

Список литературы

1. Yellareddygar S. R., Taylor R. J., Pasche J. S., Gudmestad N. C. Quantifying control efficacy of fungicides commonly applied for potato early blight management //Plant disease, 2019. – V. 103(11). – P. 2821–2824.
2. Анисимов Б. В. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – М.: Картофелевод, 2009. – 270 с.
3. Chen G. et al. Effective and sustained control of soil-borne plant diseases by biodegradable polyhydroxybutyrate mulch films embedded with fungicide of prothioconazole. // Molecules, 2021. – V. 26. – P. 762.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВОБОДНОЙ И ДЕПОНИРОВАННОЙ ФОРМ МЕТРИБУЗИНА *

О. Д. Петровская

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

Большое значение в отношении пестицидного загрязнения имеет та группа гербицидов, основным механизмом действия которых является блок фотосинтетических функций. Одним из самых перспективных практических применений метода флуоресценции является использование его для оценки влияния гербицидов на состояние растений. Подавление фотосинтетической активности в результате воздействия гербицидов приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, излучаемой листом. Главное преимущество данного экспресс-метода заключается в возможности оценки работы фотосинтетического аппарата и эффективности процесса фотосинтеза, а также детекции наличия повреждений задолго до проявления внешних признаков гибели растения [1-3].

Цель – исследование влияния свободной и депонированной форм препарата метрибузина на изменения показателей фотосинтетической активности сорняков (Щирица запрокинутая (*Amaránthus retrofléxus*), Одуванчик полевой (*Taráxacum officinále*), Звездчатка средняя (*Stellaria media*), Марь белая (*Chenopodium album*), Осот полевой (*Sonchus arvensis*)) в полевых культурах овощных (свекла, томаты) и зерновых культур (пшеница, ячмень).

Материалы и методы

Для выявления механизма повреждающего действия гербицидов использована флуоресценция хлорофилла, которая позволяет оценивать потенциальную продуктивность и структурную организацию фотосинтетического аппарата растений, проводить раннюю диагностику повреждения листьев. В ходе эксперимента регистрировали следующие параметры флуоресценции: $Y(II)_{\max}$ – максимальный квантовый выход ФСII; $Y(NPQ)_{\max}$ – максимальный квантовый выход нефотохимического тушения; ETR_{\max} – максимальная скорость нециклического транспорта электронов.

Результаты измерения параметров флуоресценции хлорофилла при внесении метрибузина представлены на рисунке. В группе отрицательного контроля (интактные растения, выращиваемые без применения гербицидов) динамика и вариабельность показателей флуоресценции связаны с видовыми особенностями и фазами роста сорняков. В отрицатель-

© Петровская О. Д., 2021

* Работа выполнена в рамках мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь.

ном контроле у всех сорных растений значения максимального квантового выхода PSII на всем протяжении эксперимента составляли порядка 0,7–0,8, что является нормой для нормального функционирования фотосинтеза. В тоже время другие показатели фотосинтетической активности в ходе развития и естественного старения исследованных сорняков изменялись существенно и различно. Ингибирующее действие метрибузина проявилось в снижении значений скорости фотосинтетического транспорта электронов и максимального квантового выхода PSII у всех исследуемых сорняков, за исключением Осота полевого, у которого ответная реакция на действие метрибузина в большей степени проявлялась в снижении ETR_{max} при применении депонированной формы МЕТ. В опыте со Звездчаткой средней применение препаратов МЕТ также в основном отразилось на снижении ETR_{max} , но более существенном, применение депонированной формы повлекло снижение значений ETR_{max} более чем на 60 % на 23 сутки и продолжало заметно влиять до конца эксперимента, а использование свободной формы снизило данный показатель на 35 % только в начале эксперимента. По отношению к остальным сорнякам выраженное ингибирующее воздействие обеих форм МЕТ отмечено на показатели ETR_{max} и $Y(II)_{max}$, за исключением Одуванчик обыкновенный, у которого применение депонированного МЕТ вызвало и снижение $Y(NPQ)_{max}$ на 20–30 % в большей части эксперимента.

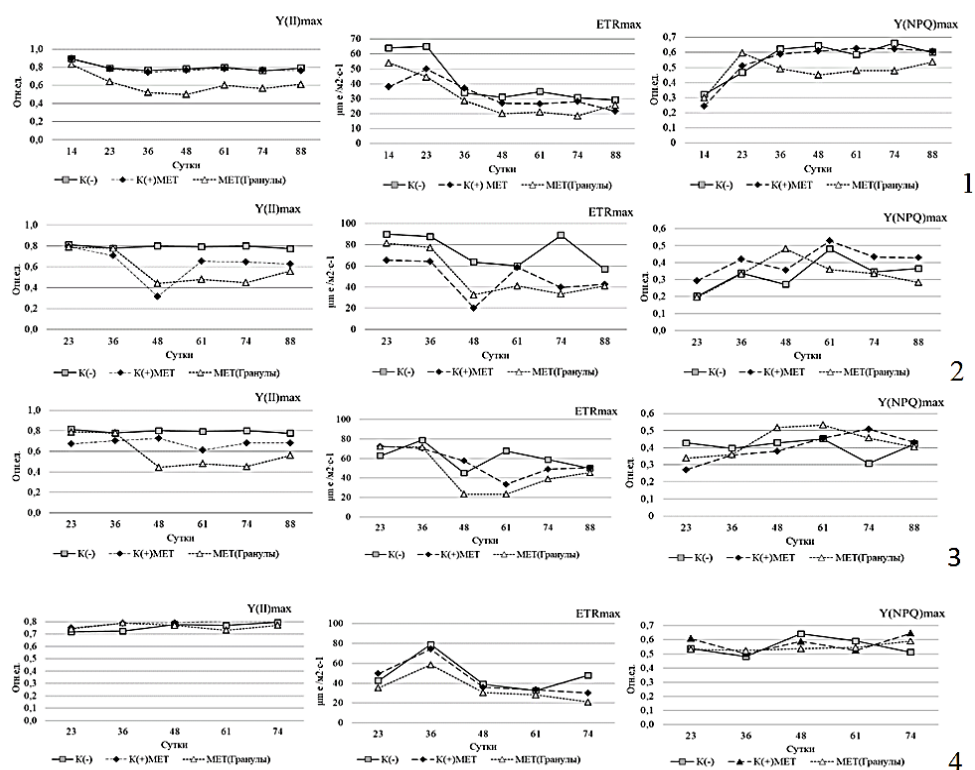


Рис. 1. Изменение показателей флуоресценции хлорофилла сорных растениях при внесении свободных и экспериментальных форм метрибузина в посевы овощных культур: Одуванчик обыкновенный (1), Марь белая (2), Щирица запрокинутая (3), Осот полевой (4)

Выявлено, что свободная форма МЕТ практически не оказало существенного влияния на исследуемые показатели у Одуванчика обыкновенного в отличие от пролонгированного воздействия депонированного МЕТ. Наиболее восприимчивыми к действию препаратов оказались Марь белая и Щирица запрокинутая, в опытах с которыми зафиксированы снижения ETR_{max} и $Y(II)_{max}$ более 60 % при применении обеих форм МЕТ.

Заключение

Исследованиями показано более выраженное влияние депонированной формы МЕТ на показатели фотосинтетической активности большинства сорных растений по сравнению с применением этого гербицида в свободной форме.

Список литературы

1. Follak S. Effect of airborne bromoxynil–octanoate and metribuzin on non-target plants / S. Follak, K. Hurlle // *Environmental Pollution*. – 2003 – Vol. 1262 – P. 139–146.
2. Дремова М. С. Изменение хлорофилльных показателей в растениях яровой пшеницы при обработке посевов гербицидными препаратами // *Вестник алтайского государственного аграрного университета* – 2009 – Т. 6. № 56 – С. 10–13.
3. Frankart C. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor* / C. Frankart, P. Eullaffroy, G. // *Verne Environmental and Experimental Botany* – 2003 – Vol. 49 – P. 159–168.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ФОРМ ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ ПОСЕВАХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР, ЗАРАЖЕННЫХ СОРНЯКАМИ

О. Д. Петровская

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

Гербициды составляют одну из самых больших групп пестицидов, используемых для защиты культурных растений от сорняков. Большинство применяемых гербицидов не достигает намеченной цели, что приводит в конечном итоге к загрязнению почвы и грунтовых вод [1]. В последние годы инкапсуляция гербицидов в полимерную матрицу приобретает все большее значение в связи с тем, что контролируемое высвобождение гербицидов приводит к повышению активности препарата по сравнению с традиционным методом их использования, а также наносит минимальный вред окружающей среде [2]. Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразлагаемые полимеры микробиологического происхождения являются перспективными материалами для создания таких систем. Свойства ПГА, такие как биоразлагаемость и биосовместимость открывают им перспективу построения долгосрочных форм препаратов на их основе [3].

Целью работы является исследование эффективности экспериментальных форм препаратов гербицидного действия.

Материалы и методы

Образцы полимера П(ЗГБ-со-ЗГВ) были синтезированы с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 по авторской технологии [4]. В качестве наполнителя полимера использовали березовые опилки. Трибенурон-метил (далее ТРИБ) использовали в качестве гербицида. Конструирование экспериментальных форм препаратов в виде гранул проводили методом окатывания с применением гранулятора Formag (Германия). Соотношение П(ЗГБ-со-ЗГВ)/Древесные опилки/ТРИБ составляло 50/30/20 %. Гербицидную активность исследуемых форм изучали в почвенных микросистемах пшеницы сорта «Новосибирская 15» (*Triticum aestivum*), засоренных Горчицей полевой (*Sinapis arvensis*). Одновременно с посевом в почву вносили гранулы с депонированным гербицидом. В качестве положительного контроля в почву вносили раствор свободных гербицидов в концентрации, рекомендованной для полевого применения. Растения выращивали в климатической камере (Фитотрон-ЛиА-2 (Россия)). В ходе эксперимента регистрировали количество и высоту стебля сорняков и зерновых культур.

Результаты

Исследована гербицидная активность свободного и депонированного гербицида трибенурон-метила [(П(ЗГБ-со-ЗГВ)/березовые опилки/ТРИБ]

в лабораторных посевах пшеницы сорта «Новосибирская 15», зараженных сорным растением Горчица полевая. Внесение гербицидных препаратов в обоих вариантах эксперимента снижало количество сорняков (см. рис. 1). Гербицидный эффект обеих форм ТРИБ был зафиксирован уже на 7 сутки. Массовая гибель сорняков отмечена на 14 сутки, при этом более значительно - под действием депонированной формы ТРИБ. Эти различия гербицидной активности форм далее проявлялись более наглядно. На 28 сутки при внесении экспериментальных форм ТРИБ количество сорняков в лабораторных посевах снизилось до 20 %. Под действием свободного ТРИБ эффект был менее значительным, остаточное количество сорняков было на уровне 40 %.

Рис. 1 иллюстрирует замедление роста сорняков под действием двух форм ТРИБ. Высота интактных растений возрастала в ходе опыта и к концу наблюдения составила 9 см. Ингибирование роста сорных растений обеими формами ТРИБ негативно влияло на их высоту. Высота оставшихся сорных растений под действием свободного и депонированного гербицида составила, соответственно, 4 и 3 см.

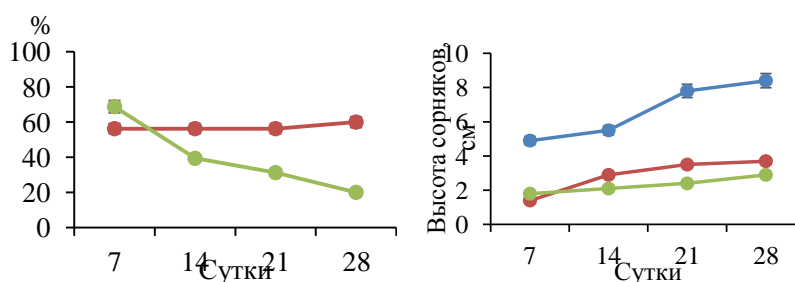


Рис. 1. Динамика гибели и высота сорных растений Горчица полевая (*Sinapis arvensis*) при действии свободной (контроль +) и депонированной формы трибенурон-метила в виде гранул

В табл. 1 представлены результаты оценки состояния посевов пшеницы под действием двух форм ТРИБ по сравнению с интактными растениями.

Таблица 1

Влияние различных форм пестицидов на высоту стебля и плотность посевов яровой пшеницы сорта «Новосибирская 15»

Сутки	Яровая пшеница сорт «Новосибирская 15»					
	Контроль (-)		ТРИБ (+)		ТРИБ (гранулы)	
	Количество, шт./м ²	Высота, см	Количество, шт./м ²	Высота, см	Количество, шт./м ²	Высота, см
7	1 234	17,3	1 111	16,3	1 234	15,7
14	1 234	29,0	1 111	27,9	1 234	26,1
21	1 234	34,7	1 111	37,3	1 234	31,6

Наблюдения за состоянием посевов пшеницы в течение 21 суток (до периода массовой гибели сорняков) существенных различий не выявило. Общее количество растений (их плотность) и высота, в общем, были сопоставимыми. Выявленные отличия в показателях на уровне 10 % свидетельствуют об отсутствии достоверного и негативного влияния пестицидов на развитие пшеницы.

Заключение

Исследована эффективность применения экспериментальных форм препаратов гербицидного действия в лабораторных посевах пшеницы сорта «Новосибирская 15», засоренная Горчицей полевой. Результаты эксперимента показали, что применение экспериментальных форм трибену-рон-метила увеличило его гербицидную активность за счет пролонгированного действия. Внесение экспериментальных форм ТРИБ в лабораторные посева позволило снизить количество сорняков до 20 %, а также замедлить их рост. Внесение экспериментальных препаратов не оказало влияние на зерновые культуры.

Список литературы

1. Wang Y., Qian C., Yan X., Liu H. Preparation and Characterization of Controlled Release Poly(MelamineFormaldehyde) Microcapsules Filled with 2,4-D Isooctyl // Ester. Int. J. Polym. Mat. Polym. Biomater. – 2017. – 66. – P. 963–969.
2. Shershneva A. M., Murueva A. V., Zhila N. O., Volova T. G. Antifungal activity of PЗНВ microparticles containing tebuconazole // Journal of Environmental Science and Health, Part B – 2019. – P. 196–204.
3. Zhila N., Murueva A., Shershneva A., Shishatskaya E., Volova T. Herbicidal activity of slow-release herbicide formulations in wheat stands infested by weeds // Journal of Environmental Science and Health, Part B. – 2017. – P. 729–735.
4. Киселев Е. Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства / Е. Г. Киселев, А. В. Демиденко, С. В. Барановский, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. – 2014. – № 7 – С. 134–147.

ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕПОНИРОВАННОГО ГЕРБИЦИДА ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛА В ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ *

**Е. Г. Киселев^{1,2}, С. В. Барановский¹, А. В. Демиденко^{1,2},
Н. Л. Кураченко³, В. Л. Бопп³**

¹*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79*

²*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50*

³*Красноярский государственный аграрный университет,
Россия, Красноярск, просп. Мира, 90*

Интенсивные технологии ведения сельского хозяйства требуют применения огромного количества разнообразных химических веществ для борьбы с вредителями, сорняками и возбудителями болезней культивируемых видов. Современная практика в основном базируется на применении химических методов и средств, включающих предпосевное протравливание посадочного материала и обработку растений опрыскиванием растворами пестицидов в период вегетации. Масштабы производства и применения пестицидов возрастают во всем мире. По данным [1], темпы роста объема производства пестицидов составляют 6,9 % в год. При этом не более 10 % применяемых и вносимых в окружающую среду пестицидов достигает цели; основная масса этих веществ аккумулируется в биологических объектах, загрязняет почвы, водоемы, вызывает гибель полезных организмов и нарушает равновесие в природных экосистемах [2]. Многие из применяемых пестицидов в недостаточной мере отвечают требованиям, как пищевой безопасности, так и безопасности природных экосистем и биосферы в целом. Указанные обстоятельства и высокая экономическая затратность химической защиты вызывают необходимость разработки экологически безопасных средств и способов их применения для снижения пестицидного пресса на природные экосистемы и окружающую среду в целом.

Новейшим направлением исследований является разработка и применение в сельском хозяйстве препаратов нового поколения с контролируемым выходом активного начала за счет использования для депонирования биоразрушаемых материалов, которые разрушаются в почве под воздействием почвенной микрофлоры до безвредных продуктов и обеспечивают постепенный и длительный выход действующих веществ в почву [3]. Ключевым моментом для создания пролонгированных препаратов является материал, который используют в качестве основы для депонирования пестицидов. Наиболее перспективными являются

© Киселев Е. Г., Барановский С. В., Демиденко А. В., Кураченко Н. Л., Бопп В. Л., 2021

* Работа выполнена в рамках мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220; VI очередь.

биоразрушаемые полимерные материалы, которые разрушаются в почве естественной микрофлорой, обеспечивая длительный и постепенный выход пестицидов.

Цель работы – полевые испытания эффективности применения гербицида трибенурон-метила, депонированного в матрикс на основе разрушаемого микробного биопластика – поли-3-гидроксibuтирата.

Материалы и методы

Системный гербицид трибенурон-метил (ТРИБ), депонировали в смесовую основу в виде гранул «П(ЗГБ)/березовые опилки» с соотношением компонентов как 50:40:10 вес.%. Гранулы были внесены в почву одновременно с семенами яровой пшеницы «Новосибирская 15» при посеве. Для сравнения (в группе положительного контроля) для опрыскивания посевов использовали коммерческий сертифицированный гербицидный препарат «Мортира» (фирм «Август», Россия). Полевые испытания проведены согласно нормативному документу Министерства сельского хозяйства России [4] в пригороде Красноярска на базе учебного хозяйства «Миндерлинское» ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет». Фенологические наблюдения посевов пшеницы включали регистрацию сроков начала и массового наступления фаз развития растений; в течение вегетационного сезона проводили фотодокументирование и обследование культуры по ключевым датам (18 июня – в фазе кущения в группе положительного контроля произведена обработка растений опрыскиванием гербицидным препаратом Мортира); 2 июля и 3 августа оценивали состояния посевов, соответственно, через две и шесть недель после обработки растений гербицидным препаратом в положительном контроле; 25 августа произведена уборка урожая.

Результаты

В течение вегетации посевы пшеницы проходили обычные фазы роста и развития: всходы, кущение, выход в трубку, колошение, цветение, налив и созревание. На рис. 1 представлены фото посевов пшеницы в трех исследованных группах в сроки 18.06; 02.07 и 03.08, что соответствовало фазе кущения перед опрыскиванием посевов препаратом Мортиры в положительном контроле, через 2 и 6 недель после опрыскивания.



Рис. 1. Фото полевых посевов яровой пшеницы «Новосибирская 15» при различных способах применения гербицидного препарата

Фаза образования 3-го листа у пшеницы во всех группах растений зафиксирована на 10 день после появления всходов; начало кушения – 12 июня. Благоприятные условия обусловили активное образование побегов из подземных стеблевых узлов в течение 6-ти дней. В этот период все растения перешли в фазу полного кушения. С 20 июня отмечен выход в трубку, характеризующийся началом роста стебля и формированием генеративных органов растений. Через 8 дней от начала выхода в трубку (28 июня) зафиксировано появление флагового листа у растений. Фаза колошения пшеницы, характеризующаяся появлением соцветия из влагалищного верхнего листа, полностью наступила 7 июля. В этой фазе отмечался усиленный рост листьев, стеблей и формирование колоса. Влажная и теплая погода определила формирование хорошо развитых цветков в колосе. Через 3 дня после полного колошения отмечено начало цветения. Созревание яровой пшеницы в фазе восковой спелости отмечено 23 августа. Через 3 дня растения семена приобрели полную спелость и готовность к уборке. В ходе вегетационного сезона показано, что наступление фенологических фаз яровой пшеницы не зависело от способа применения трибенурина.

Результирующим показателем всех факторов, оказывающих воздействие на рост и развитие растений в течение вегетации, служит урожай

и его структура. При разработке технологии возделывания, направленной на оптимальное развитие каждого элемента, необходимо учитывать, что урожай формируется за счет различных элементов, степень выраженности которых может быть разной. Исследованиями установлено, что структура урожая яровой пшеницы имела более высокие показатели при применении гербицида по сравнению с интактными растениями. Выявлена также зависимость большинства показателей структуры урожая от формы и способа применения трибенурон-метила (см. табл. 1).

Таблица 1
 Структура урожая яровой пшеницы «Новосибирская 15»
 при применении сводной и депонированной форм трибенурон-метила

Показатель	Контроль «-» (интактные растения)	Контроль «+»	Эксперимент
		Опрыскивание посевов препаратом Мортира	Довсходовое внесение депонировано ТРИБ
Число растений, шт./м ²	345,0 ± 17	343,0 ± 20	348,0 ± 17,0
Высота растений, см			
18 июня	33,8 ± 1,5	36,0 ± 0,9	39,2 ± 1,1
02 июля	75,4 ± 5,1	77,2 ± 4,7	79,8 ± 6,2
03 августа	92,3 ± 7,6	95,1 ± 5,9	101,9 ± 8,4
25 августа	99,3 ± 7,9	106,9 ± 8,0	114,1 ± 10,0
Число продуктивных стеблей, шт./м ² :		997,0 ± 49,0	1042 ± 50
• общих	986,0 ± 50,0		
• продуктивных	972,0 ± 59,0	979,0 ± 52,0	1008 ± 49
Длина колоса, см	6,8 ± 0,4	7,1 ± 0,4	7,3 ± 0,4
Число колосков в колосе	13,0 ± 0,8	13,2 ± 0,8	13,5 ± 0,8
Масса одного зерна, г	0,027	0,033	0,040
Масса зерна с колоса, г	0,72	0,95	1,24
Масса соломы, г/м ²	1145,0 ± 57,3	1499,0 ± 45,8	1695,0 ± 84,7
Урожайность, ц/га	31,5 ± 1,2	32,5 ± 0,5	33,6 ± 1,5

Технология химической обработки влияла на урожайность яровой пшеницы: без применения гербицида урожайность составила 31,5 ± 0,4 ц/га; при опрыскивании посевов препаратом Мортира урожай был выше (32,5 ± 0,5 ц/га) и еще результативнее – при использовании депонированного трибенурон-метила (33,6 ± 0,4 ц/га). Как было отмечено выше,

удобрения в почву не вносили, и полученная прибавка урожая связана исключительно с подавлением в посевах сорняков.

Биологическая эффективность депонированного трибенурон-метила, оцениваемая по динамике гибели сорняков, составила 92,3 %, что многократно превосходит результаты в положительном контроле (15,4 %).

Заключение

Полевые испытания показали, что депонированный гербицид ТРИБ превосходит по биологической эффективности традиционное опрыскивание сорных растений свободной формой гербицида в составе коммерческого препарата. сконструированная форма ТРИБ, депонированного в разрушаемую основу П(ЗГБ)/березовые опилки, обеспечила длительное функционирование в почве весьма неустойчивого препарата и эффективно подавляла развитие сорняков. Это положительно сказалось на урожайности пшеницы.

Список литературы

1. Рынок пестицидов, конечный потребитель, география применения – Глобальные тенденции и прогнозы. // АгроПравда. – URL: <http://agropravda.com/news/chimiya-dla-pochvy/1473-mirovoj-rynok-pesticidov-k-2019-g-sostavit-759-mlrd>
2. Mineau, P., Whiteside, M. (2013). Pesticide acute toxicity is a better correlate of US grassland bird declines than agricultural intensification. PLoSOne, 8(2), e57457.
3. Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture / Springer 2020 – 266р.
4. Сычев В. Г., Шаповалов В. А., Можарова И. П. и др. Руководство Минсельхоза РФ по проведению регистрационных испытаний агрохимикатов в сельском хозяйстве (2018). М: Росинформагротех (РГБНУ). 208 с.

БИОДЕГРАДАЦИЯ СОРБЕНТОВ «УНИСОРБ» И «УНИСОРБ-БИО» ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРОЙ

К. Д. Бондаренко

*Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79;
e-mail: kseniya.bondaenko@yandex.ru*

Среди известных методов очистки нефтезагрязненных почв заслуживает особого внимания биоремедиация (очистка почвы с использованием метаболического потенциала микроорганизмов). Для очистки нефтяных загрязнений применяют препараты на основе микроорганизмов, способных окислять углеводороды и использовать их в качестве источника энергии для своей жизнедеятельности [1]. Микробиологическая деструкция поллютантов обладает важным преимуществом перед другими методами: она гарантирует более полную степень очистки, экологическую безопасность, относительную дешевизну [2]. С помощью сорбентов процесс биоремедиации можно сделать более эффективным. Разложение нефти происходит за счет физико-химических факторов и естественных процессов природного самоочищения, которое активируется биосорбентом. Имобилизация микроорганизмов на полимерный сорбент, помимо закрепления в загрязненной экосистеме, способствует повышению ферментативной активности и устойчивости микроорганизмов к неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды и ускоряет процессы биодеградации нефтяных углеводородов [3]. Однако сорбент не удаляется из почвы долгое время, что затрудняет полную очистку территорий.

Цель работы – поиск микроорганизмов, способных разрушать сорбенты «Унисорб» и «Унисорб-Био» при восстановлении нефтезагрязненных почв.

В задачи исследования входило: выделение из нефтезагрязненной почвы микроорганизмов, способных разрушать сорбент и использовать его в качестве субстрата; изучение свойств выделенных микроорганизмов и идентификация; сравнительный анализ видового состава микроорганизмов, выделенных из накопительных культур с сорбентом «Унисорб» и «Унисорб-био».

Материалы и методы

Объектом исследования являлись почвенные бактерии, выделенные из накопительных культур с добавлением нефтезагрязненной почвы. Содержание нефти в почве составляло 16%. Накопительные культуры получали на жидкой питательной среде – модифицированной среде Чапека, где в качестве источника азота в среду вносили один из видов сорбента: «Унисорб» (универсальный сорбент на основе вспененного карбамида) или «Унисорб-Био» (карбамидный сорбент с иммобилизованной

нефтеокисляющей микрофлорой). Колбы с накопительной культурой инкубировали на шейкере при 120 об./мин., температуре 25 °С в течении 2 недель. Чистые культуры бактерий получали, высевая на питательный агар методом истощающего посева. Исследовали цитоморфологические и физиолого-биохимические свойства выделенных культур: тест на липазную, лецитиназную, амилазную, протеазную активность, способность ферментировать углеводы. Видовая идентификация выделенных культур была произведена методом MALDI TOF времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI Biotyper, Bruker Daltonik).

Результаты

Из накопительной культуры с сорбентом «Унисорб» было выделено и идентифицировано 6 видов бактерий: *Cellulosimicrobium cellulans*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus centrosporus*, *Streptomyces violaceoruber*, *Paenibacillus rhizosphaerae* (рис. 1). Из накопительной культуры с сорбентом «Унисорб-био» выделено и идентифицировано 5 видов бактерий: *Achromobacter xyloxidans*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter spanius*, *Pseudomonas synxantha* (рис. 2).

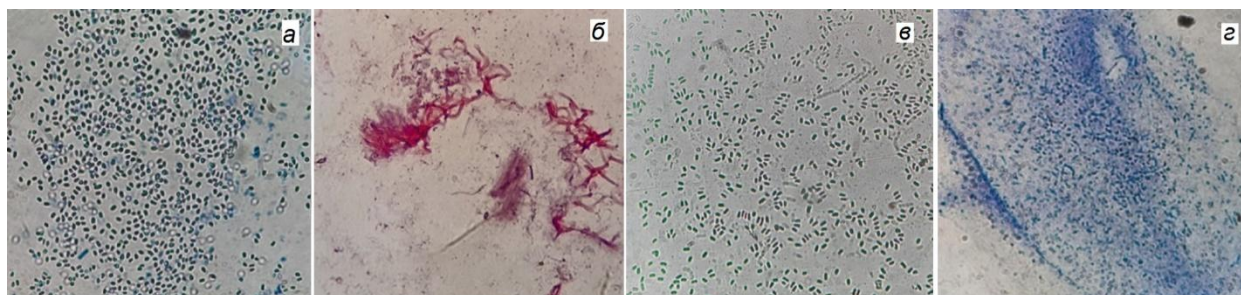


Рис. 1. Микрофотографии бактерий, участвующих в биодеградации сорбента «Унисорб»: а – *Bacillus pumilus*; б – *Streptomyces sp.*; в – *Cellulosimicrobium cellulans*; г – *Paenibacillus rhizosphaerae*

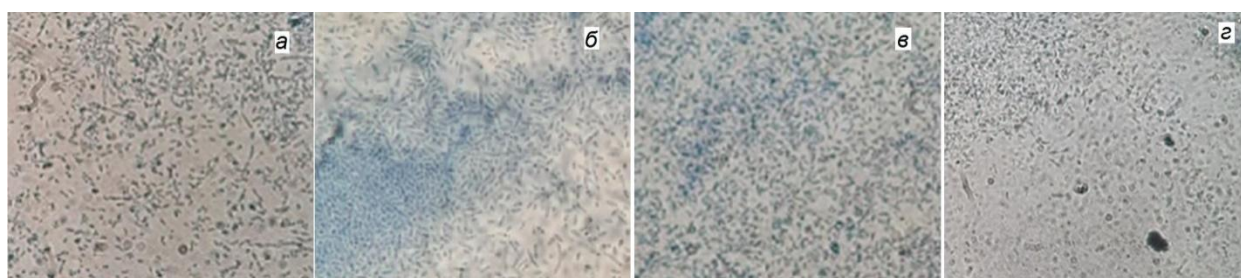


Рис. 2. Микрофотографии бактерий, участвующих в биодеградации сорбента «Унисорб-Био»: а – *Achromobacter xyloxidans*; б – *Achromobacter spanius*; в – *Stenotrophomonas rhizophila*; г – *Pseudomonas synxantha*

Видовой состав двух накопительных культур получился разнообразным и без совпадающих штаммов. Однако у многих микроорганизмов имеется ряд схожих морфологических и биохимических свойств. Вид

A. denitrificans, а также бактерии рода *Pseudomonas* и *Streptomyces spp.* способны восстанавливать нитраты до нитритов. Большинство штаммов активно используют различные углеводы, а кроме того, микрофлору данных культур объединяет наличие видов, способных к деградации полимеров, например, *A. xylooxidans*, *A. denitrificans*, *C. cellulans*, *Streptomyces spp.* Некоторые виды перспективны для использования в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста растений: *P. rhizosphaerae*, *P. synxantha*, *A. spanius*, *S. rhizophila*. Многие виды из культуры с сорбентом «Унисорб-Био» устойчивы к широкому спектру антибиотиков. Почти все виды имеют широкий температурный и кислотный диапазон пригодный для роста. Следует отметить, что в накопительной культуре с сорбентом «Унисорб» все штаммы грамположительные, тогда как штаммы из накопительной культуры с сорбентом «Унисорб-Био» – грамотрицательные.

Заключение

Выделенные виды бактерий обладают высокой ферментативной активностью, устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды и могут перестроиться под изменяющиеся условия. Это способствует биодеградации сорбентов в почве даже в условиях высокой концентрации нефтяных загрязнений.

Список литературы

1. Фомина Н. В. Ферментативная активность нефтезагрязненного почвогрунта после применения биоактивного сорбента // Эпоха науки. – 2016. – С. 42.
2. Иванова М. А., Чикина Н. С., Зенитова Л. А. Ликвидация нефтяных загрязнений // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 29. – №. 3. – С. 1-12.
3. Рязанова Т.В., Федорова О.С., Лоскутов С.Р. Деструкция нефти иммобилизованной микрофлорой // Журнал Сибирского федерального университета. Химия, 2018. – Т. 11(2). – С. 184-196.

РЫНОК СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В РФ

О. Н. Шишацкий

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50;
e-mail: shishatskiy@mail.ru*

В СФУ реализуется мега-грант «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация», цель которого заключается в разработке научных основ конструирования экологически безопасных и эффективных форм препаратов для защиты сельскохозяйственных культур от сорняков и возбудителей болезней с адресным и контролируемым выходом активного начала за счет использования в качестве основы биоразрушаемых полимеров.

Разрабатываемая в рамках проекта технология – создание и применение в сельском хозяйстве агропрепаратов с контролируемым высвобождением действующих веществ (д.в.) в качестве средств защиты растений (СЗР). Агропрепараты с контролируемым высвобождением – это комбинация действующих веществ средств защиты растений и разрушаемой полимерной основы. Агропрепараты с контролируемым высвобождением обеспечивают доставку д.в. к мишени с контролируемыми скоростями в течение заданного периода времени. В качестве основы в разрабатываемых препаратах используют биоразлагаемые полимеры микробного происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА), при разложении которых в окружающей среде не образуется токсичных веществ. Для того чтобы точно настроить характеристики агропрепаратов, разрабатываемых в рамках проекта, в соответствии с потребностями потенциальных потребителей и оценить объемы предполагаемого выпуска, необходимо провести анализ современных рынков средств защиты растений. Положение дел на глобальном рынке СЗР рассмотрено в статье [1]. В настоящей работе анализируется ситуация на российском рынке СЗР.

Цель работы – анализ динамики и текущего состояния российского рынка СЗР, определение тенденции развития рынка и крупных отечественных производителей СЗР; формулирование бизнес-модели применения результатов интеллектуальной собственности (ИС).

Материалы и методы

Обзор национальной и международной статистики, информации из деловых и отраслевых изданий, публикаций по теме «Средства защиты сельскохозяйственных растений».

Результаты

В СССР в доперестроечный период спрос на пестициды удовлетворялся полностью, при этом на 80 % за счет отечественного производства.

В период реформирования экономических отношений предприятия не смогли конкурировать с крупными зарубежными концернами и были вытеснены с рынка средств защиты растений. В период реформ в 90-е годы существенно снизилась государственная плановая поддержка; рынок пестицидов сократился и на нем стали доминировать крупные зарубежные производители. Отечественные производители прекратили выпуск действующих веществ для химических средств защиты растений. Емкость рынка в 1996–2000 гг. составила лишь 29,6 тыс. т пестицидов, а объемы их применения – 28,4 млн. га [2, 3].

В настоящее время в России сформировался рынок пестицидов, состоящий из двух компонент: первая – это поставки крупных зарубежных фирм, которые обеспечивают российских производителей действующими веществами пестицидов; вторая – это поставки российским сельхозпроизводителям готовых препаратов, которые производятся иностранными и отечественными компаниями.

Таким образом, предприятия РФ выпускают пестициды с использованием зарубежных действующих веществ, по сути – завершая в России производственные циклы зарубежных производств.

В последние годы отмечается существенный рост применения СЗР в растениеводстве РФ. Так, 2010 по 2019 гг. увеличение применения пестицидов составило 74,5 % [4]. Основная причина того, что в России наблюдается существенное увеличение применения пестицидов, заключается в том, что ранее СЗР в стране применялись в количестве, ниже уровня, необходимого для достижения высоких урожаев. Сейчас ситуация меняется в сторону оптимизации технологий и объемов применения СЗР, и многие аналитики отмечают, что Россия обладает значительным потенциалом дальнейшего роста этого показателя.

В табл. 1 приведены данные о предложении пестицидов за год, которое определяется как складские запасы пестицидов на начало года плюс объем пестицидов, завезенных из-за рубежа или произведенных внутри страны в течение года.

Таблица 1

Объем 2016–2020 гг. и прогноз 2021–2025 гг.
 предложения пестицидов, РФ, (тыс. т; %) [5]

Параметр	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
Предложение, тыс. т	178,4	206,7	203,4	206,2	239,8	248,1	255,9	268,7	284	297,7
Динамика, % к предыдущему году	–	15,9	–1,6	1,4	16,3	3,4	3,2	5,0	5,7	4,8

В 2020 году суммарная выручка 50 крупнейших производителей пестицидов в РФ составила 71,3 млрд. рублей. В таблице 2 представлены 10 предприятий (имеющие основной вид деятельности по ОКВЭД: 20.20

«Производство пестицидов и прочих агрохимических продуктов») с наибольшим размером выручки за 2020 год. Ведущими производителями пестицидов на отечественном рынке являются с большим отрывом от других – АО «Август» и АО «Щелково Агрохим».

Таблица 2

Организации РФ с наибольшим объемом выручки
в 2020 году по коду ОКВЭД 20.20

«Производство пестицидов и прочих агрохимических продуктов»

Место	Организация	Показатели, млн. руб.	
		выручка	активы
1	АО Фирма «Август»	31 021	44 722
2	Акционерное Общество «Щелково Агрохим»	19 805	32 926
3	ООО «АВГУСТ-АЛАБУГА»	4 489	10 450
4	ООО «ЗЕМЛЯКОФФ КРОП ПРОТЕКШЕН»	2 320	1 324
5	ООО «АГРУСХИМ-АЛАБУГА»	1 820	2 746
6	ООО «Кирово-Чепецкий завод "Агрохимикат"»	1 571	1 570
7	АО «ЭФЭМСИ ВОЛГА»	1 193	2 372
8	ООО «Волга Индастри»	998	888
9	ООО «СЭЙФТИ ФИЛД КОРПОРЕЙШН»	866	630
10	ООО «ДОКТОР ФАРМЕР»	659	210

Если ведущие агрохимические компании предполагают участвовать в наблюдающемся в последние годы увеличении производства продукции отечественного растениеводства, оставаясь конкурентоспособными с новыми выходящими на рынок предприятиями, им следует ускорить разработку новой продукции для защиты растений. Этим компаниям, помимо своих внутренних НИОКР по разработке новых СЗР и способов их доставки, необходимо рассмотреть варианты инвестирования в перспективные молодые компании с помощью специфичных для открытых инноваций моделей финансирования.

Потенциальными потребителями агропрепаратов нового поколения могут стать не только российские, но и зарубежные растениеводческие хозяйства. Агропрепараты нового поколения могут постепенно полностью заместить применяемые в настоящее время традиционные СЗР, поскольку позволяют повысить рентабельность производства сельскохозяйственной продукции по сравнению с традиционным применением коммерческих химических средств защиты растений, снизить риск неконтролируемого распространения и аккумуляции пестицидов в биосфере [6].

На наш взгляд, перспективным вариантом практического внедрения ИС, создаваемой в рамках проекта «Агропрепараты нового поколения...», может стать покупка одной из ведущих агрохимических компаний малого

предприятия (стартапа), на который будет зарегистрирована разрабатываемая в рамках мага-гранта ИС. В рамках такой бизнес-модели коммерциализации агрохимическая компания получает возможность вкладывать ресурсы и компетенции в разработку и создание СЗР нового поколения и выведения этой продукции на рынок, а исследователи с использованием дополнительных ресурсов смогут активнее проводить масштабные исследования, в том числе в части разработки инновационных агропрепаратов.

Список литературы

1. Шишацкий О. Н. (2021) Глобальная индустрия защиты растений. Журнал СФУ-Биология (в печати).
2. Захаренко В. А. Рынок пестицидов РФ и перспективы его развития. Защита и карантин растений. – 2014, № 11. – С. 3–6.
3. Захаренко В. А. Научное обеспечение производства, рынка и реализации пестицидов в аграрном секторе Российской Федерации. Агрохимия. – 2014 – №4. – С. 3019.
4. Food and agriculture data FAOSTAT - URL:<http://www.fao.org/faostat/ru/#data>
5. Busines Stat (2021) Анализ рынка пестицидов в России в 2016–2020 гг., прогноз на 2021–2025. URL:https://businesstat.ru/images/demo/pesticides_russia_demo_businesstat.pdf.
6. Шарапатова А. В., Брюханова Е. А., Шишацкий О. Н. (2021) Технико-Экономическая оценка эффективности применения пестицидных препаратов нового поколения. – Журнал СФУ. Биология (в печати).

ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕСТИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ *

А. Шарапатова¹, О. Шишацкий^{2,3}, В. Бопп¹

¹*Красноярский государственный аграрный университет,
Россия, Красноярск, просп. Мира, 90*

²*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Россия, Красноярск, Академгородок, 50/50*

³*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79*

Необходимость наращивания объемов растениеводства, в первую очередь – производства зерновых культур, диктуется ростом населения, для которого зерно является одним из главных источников продуктов питания, а также расширением потребительской базы животноводства и птицеводства, где зерно – один из основных компонентов кормов. Но земельный ресурс не безграничен. Почв, отвечающих требуемым условиям и пригодных для сельскохозяйственного производства, не так много. Потому требует решения вопрос, как с уже имеющихся площадей получать более высокие урожаи. Выход видится в организации рационального применения средств защиты растений для борьбы с сорными растениями и фитопатогенами, являющимися наряду с вредителями, одной из главных причин снижения урожайности сельскохозяйственных культур. Перспективность новых препаратов для защиты растений и возможность их практического использования определяются не только биологической эффективностью в сравнении с традиционными средствами и технологиями применения, но в значительной мере зависит от технико-экономических показателей их производства и применения.

Цель работы – технико-экономическая оценка (ТЭО) результатов пионерных полевых испытаний долговременных пестицидных препаратов, депонированных в разрушаемую полимерную основу, которые однократно вносят в почву с семенным материалом, в сравнении с традиционными технологиями защиты сельскохозяйственных культур.

Материалы и методы

ТЭО выполнена по результатам полевых испытаний вегетационного сезона 2020 г., проведенных, согласно нормативной документации [1–3]. Полевые испытания включали свободные коммерческие пестицидные препараты (контроль) и экспериментальные формы в виде гранул, изготовленных согласно [4]. Испытаны разработанные формы системного гербицида трибенурон-метил (ТРИБ) и системного фунгицида тебуконазол

© Шарапатова А., Шишацкий О., Бопп В., 2021

* Работа выполнена за счет средств мегагранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» (Соглашение № 074–02-2018-328) по Постановлению Правительства РФ № 220 от 9 апреля 20210 г. «О мерах по привлечению ведущих ученых в вузы России» VI очередь (Соглашение СФУ и Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-626).

(ТЭБ), который испытывали в комплексе с гербицидом в (ТРИБ+ТЭБ); пестициды произведены в Китае (фирма Xi'anTai Cheng Chem Co., Ltd). В контроле использовали коммерческие аналоги (гербицид «Мортира» и фунгицид «Бункер») («Август», РФ). Полевые испытания проведены в пригороде Красноярска на базе учебного хозяйства «Миндерлинское» ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет» на яровой пшенице сорта Новосибирская 15. Семена пшеницы в экспериментальных группах вносили в почву однократно и одновременно с депонированными пестицидами. В контроле просеивной материал за студи до посева был протравлен раствором препарата Бункер; посева пшеницы в фазу кущения были обработаны раствором гербицидного препарата Мортира.

Результаты

Технико-экономический анализ включал: технологические карты структуры затрат при производстве пшеницы в зависимости от формы и способа применения пестицидных препаратов; характеристику затрат на производственные операции при производстве пшеницы с использованием коммерческих и депонированных препаратов; показатели экономической эффективности применения депонированных пестицидных препаратов.

Определение экономической эффективности применения депонированных пестицидных препаратов включает сравнение производственных затрат по всем технологическим операциям, используемым при производстве зерновых культур в агросекторе РФ. Расчёт экономической эффективности базируется на определении материальных и производственных затрат на единицу площади и единицу сельскохозяйственной продукции, сравнение урожайности и себестоимости полученной продукции, рентабельности. Производственные затраты определены по составленным технологическим картам при возделывании испытываемых сельскохозяйственных культур, которые включают прямые затраты, состоящие из затрат на основную обработку почвы, предпосевную обработку (культивация, обработка семян, посев), применение химикатов в течение вегетации, уборку урожая.

Для расчёта технологических карт по производству зерна пшеницы в качестве показателя взята посевная площадь в 1 га и данные по урожайности, полученные в полевых испытаниях. Основными статьями затрат при производстве продукции растениеводства являются оплата труда с отчислениями на социальные нужды, материальные затраты, в том числе затраты на семена, горюче-смазочные материалы, химические средства защиты растений, электроэнергию и др., амортизация, затраты на текущий ремонт сельхозтехники и прочие затраты, включающие общепроизводственные и общехозяйственные расходы. Исходя из составленных Технологических карт по возделыванию зерновых культур, в табл. 1 приведены производственные затраты и себестоимость произведенной продукции.

Таблица 1

Состав основных статей затрат на выращивание пшеницы и себестоимость 1 ц зерна, руб. при различных формах и способах применения пестицидов

Статьи затрат	Вариант			
	Контроль (опрыскивание посевов гербицидом Мортира)	Контроль (протравливание семян фунгицидом Бункер и опрыскивание посевов гербицидом Мортира)	Эксперимент (внесение гранул Трибенурон-метила при посеве)	Эксперимент (внесение гранул Трибенурон-метил+Тебуконазол при посеве)
1. Оплата труда с отчислениями на социальные нужды	2 104,26	2 151,75	1 880,59	1 898,48
2. Материальные затраты – всего	4 810,83	4 888,03	4 797,23	4 922,83
в т. ч. семена	1 350,0	1 350,0	1 350,0	1 350,0
горюче-смазочные материалы	2 211,27	2 211,27	2 120,49	2 120,49
химические средства защиты растений (семенного материала)	280,0	362,8	–	–
электроэнергия	5,2	6,24	5,38	6,77
автотранспорт	161,13	154,46	166,36	207,77
вода на производственные нужды	3,23	3,26	–	–
мелкий инвентарь	800,0	800,0	800,0	800,0
депонированные пестицидные препараты	–	–	355	437,8
3. Амортизация	1 549,38	1 558,44	1 524,87	1 533,00
4. Текущий ремонт	1 681,48	1 688,1	1 662,24	1 666,24
5. Прочие затраты	772,73	783,11	761,83	776,02
6. Общепроизводственные и общехозяйственные расходы (20 %)	1 913,73	1 943,89	1 855,35	1 889,31
Всего затрат на 1 га посева пшеницы	12 832,4	13 013,32	12 482,11	12 685,89
Себестоимость 1 ц зерна	394,8	418,4	371,5	299,9

Наибольшие затраты при производстве пшеницы имели место в положительном контроле в варианте протравливание семян препаратом Бункер и опрыскивание посевов препаратом Мортира, – 13 013,32 руб. на 1 га. Самые низкие затраты получены в экспериментальном варианте при использовании гранул с Трибенурон-метилом – 12 482,11 руб. Самая низкая себестоимость зерна пшеницы получена в экспериментальном варианте, в котором получена самая высокая урожайность пшеницы

при использовании комплексных гранул. Экономия затрат в экспериментальных группах относительно контролей составила от 180,92 до 327,43 руб. на 1 га.

Сопоставление затрат при двух исследованных способах химической защиты посевов пшеницы с применением коммерческих и экспериментальных форм пестицидов дано в табл. 2. Эксплуатационные затраты при выращивании пшеницы с учётом технологических операций «посев» и «протравливание семенного материала» в сумме составили 1 049,29 руб. Применении операций по уходу за посевами (подвоз воды, приготовление раствора для опрыскивания и опрыскивание посевов гербицидами) общая сумма эксплуатационных затрат на 1 га составила 1 621,42 руб.

Таблица 2

Структура затрат при возделывании пшеницы по основным технологическим операциям, руб. на 1 га при различных формах и способах применения пестицидов

Статьи затрат	Посев	Протравливание семян фунгицидом Бункер	Опрыскивание посевов гербицидом Мортира	Итого по операциям (2+3+4)	Посев с одновременным внесением гранул	
					Гранулы Трибенурон-метил	Гранулы Трибенурон-метил+Тебуконазол
1	2	3	4	5	6	7
1. Основная и дополнительная заработная плата с отчислениями на социальные нужды	272,85	39,33	165,15	477,33	272,85	272,85
2. Амортизация	146,21	10,38	11,65	168,24	146,21	146,21
3. Текущий ремонт агрегата	150,19	7,26	10,0	167,45	150,19	150,19
4. Горюче-смазочные материалы	289,02	–	74,86	363,88	289,02	289,02
5. Электроэнергия	–	1,26	–	1,26	–	–
6. Химикаты	–	82,83	283,23	366,06	355	437,8
7. Прочие прямые расходы	42,91	7,05	27,24	77,2	42,91	42,91
Всего затрат	901,18	148,11	572,13	1 621,42	1 256,18	1 338,98

Таким образом, при использовании технологии химической защиты посевов пшеницы с применением депонированных пестицидных препаратов в сравнении с традиционными технологиями затраты сокращаются с 1 621,42 руб./га до 1 256,18 руб./га или 1 338,98 руб./га в зависимости

от состава гранул, соответственно, с одним гербицидным препаратом или в комплексе гербицид+фунгицид. Таким образом, посев с одновременным внесением в почву депонированных пестицидов вместе с семенным материалом экономически выгоден, так как при этом происходит сокращение эксплуатационных затрат с 11,8 до 9,4 % по сравнению с затратами при осуществлении комплекса работ по посеву, протравливанию семян и опрыскиванию посевов гербицидами.

Технико-экономические исследования показали, что довсходовое грунтовое применение депонированных пестицидных препаратов за счёт сокращения затрат на операции по протравливанию семян и опрыскиванию растений в период вегетации, сопровождается увеличением урожайности пшеницы и обеспечивает экономию затрат при ее производстве на 327,34 руб. на 1 га, позитивно влияет на себестоимость продукции, повышая рентабельность производства на 66,1 % по сравнению с традиционным применением коммерческих пестицидных препаратов (табл. 3).

Таблица 3

Показатели экономической эффективности производства зерна пшеницы при различных формах и способах применения пестицидов

Показатели	Варианты			
	Контроль (опрыскивание посевов гербицидом Мортира)	Контроль (протравливание семян фунгицид Бункер и опрыскивание посевов гербицидом Мортира)	Эксперимент	
			Внесение гранул Трибенурон- метила при посеве	Внесение гранул Трибенурон- метил+ Тебуконазол при посеве
Посевная площадь пшеницы, га	1,0	1,0	1,0	1,0
Урожайность пшеницы, ц с 1 га	32,5	31,1	33,6	42,3
Затраты средств на 1 га посева пшеницы, руб.	12 832,4	13 013,32	12 482,11	12 685,89
Себестоимость производства 1 ц зерна, руб.	394,8	418,4	371,5	299,9
Средняя цена реализации 1 ц зерна, руб.	700,0	700,0	700,0	700,0
Прибыль на 1 ц зерна, руб.	305,2	281,6	328,5	400,1
Доход на 1 га посева пшеницы, руб.	22 750,0	21 770,0	23 520,0	29 610,0

Окончание табл. 3

Показатели	Варианты			
	Контроль (опрыскивание посевов гербицидом Мортира)	Контроль (протравливание семян фунгицид Бункер и опрыскивание посевов гербицидом Мортира)	Эксперимент	
			Внесение гранул Трибенурон- метила при посеве	Внесение гранул Трибенурон- метил+ +Тебуконазол при посеве
Получено прибыли на 1 га зерна, руб.	9 919,00	8 757,76	11 037,60	16 924,23
Уровень рентабельности производства пшеницы, %	77,3	67,3	88,4	133,4

Заключение

Выполненные технико-экономические исследования показали, что довсходовое грунтовое применение депонированных пестицидных препаратов, сопровождающееся увеличением урожайности яровой пшеницы Новосибирская 15, обеспечивает экономию затрат при производстве пшеницы; снижает себестоимость продукции, повышая ее рентабельность по сравнению с применением коммерческих пестицидных препаратов по традиционным технологиям.

Список литературы

1. Марченко А. В., Меньщикова А. Ф., Светлакова Т.В., Юшкова М. К. Методические рекомендации по разработке организационно-технологических карт в растениеводстве: методические рекомендации (2016) М-во с.-х. РФ, ФГБОУ ВО Пермская ГСХА. – Пермь: Изд-во ФГБОУ ВО Пермская ГСХА. 75 с.
2. Миньков С. Л. Технико-экономическое обоснование выполнения проекта: методическое пособие. (2014). Томск: ТУСУР.
3. Сычев В. Г., Шаповалов В.А., Можарова И.П. и др. Руководство Минсельхоза РФ по проведению регистрационных испытаний агрохимикатов в сельском хозяйстве (2018). М: Росинформротех (РГБНУ). 208 с.
4. Патент РФ на изобретение № 2733295 «Пестицидное средство длительного действия для грунтового применения».

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФИТОГЕНИКОВ *

О. О. Бабич, В. В. Ларина, Л. Н. Скрыпник, А. В. Пунгин

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
236000, г. Калининград, ул. А. Невского, 14, Россия; e-mail: stas-asp@mail.ru

Использование компонентов растительного сырья для включения их в рецептуры кормовых добавок является актуальным направлением для научных исследований и развертывания производства. Фитогенные кормовые добавки (фитогеники, *phytogenics*) применяются в сфере мясного производства, преимущественно в птицеводстве и свиноводстве [1]. Растущий интерес к фитогеникам определяется введением ограничительных барьеров на использование в Евросоюзе определенного перечня синтетических стимуляторов роста, относящихся к группе антибиотиков (*Antibiotic Growth Promoters*). Такие ограничения были введены в связи с опасениями развития резистентности к патогенам у животных, а впоследствии и у человека. Кроме того, введение фитогеников в кормовые добавки способствует повышению качества мясной продукции.

Биоразнообразие Калининградской области позволяет рассматривать лекарственные растения, произрастающие на ее территории, в качестве перспективного сырья для получения биологически активных веществ антимикробного действия, а в дальнейшем способных использоваться в процессе создания рецептур кормовых добавок.

Цель исследований – выделение и идентификация биологически активных соединений из лекарственных растений Калининградской области.

Результаты

Исследованы следующие растения: скумпия кожевенная (*Cotinus coggygia*), лунник оживающий (*Lunaria rediviva*), жарновец метельчатый (*Sarothamnus scoparius*), синеголовник приморский (*Eryngium maritimum*), гудайера ползучая (*Goodyera repens*), ладьянтрех надрезанный (*Corallorhiza trifida*), тайник сердцевидный (*Listera cordata*), палыдекорник пятнистый (*Dactylorhiza inaculata*), любка зеленоцветковая (*Platanthera chlorantha*), любка двулистная (*P. bifolia*).

При изучении химического состава лекарственных растений Калининградской области были выявлены их следующие специфические особенности. В скумпии кожевенной (*Cotinus coggygia*) доминируют рутин,

© Бабич О. О., Ларина В. В., Скрыпник Л. Н., Пунгин А. В., 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках исполнения Гранта Президента (Соглашение № 075-15-2021-310 от 19.04.2021 (внутренний номер МД-135.2021.1.4)).

гиперозид, феруловая кислота, кверцетин, кемпферол, дисульфуретин, сульфуретин, сульфуреин, галловая кислота, метил галлат, пентагаллоил глюкоза, 3,3',4',5,6,7–гексагидроксифлавонон, 3,3',4',5,5',7–гексагидроксифлавонон, 3-О- α -L-рамнофуранозид, 3,3',4',5,5',7–гексагидроксифлавулиум (1+), 7-О- β -Дглюкопиранозид и 3,3',4',7–тетрагидроксифлавонон. Лунник оживающий (*Lunaria rediviva*) содержит лунариамин и лунарин; жарновец метельчатый (*Sarothamnus scoparius*) богат такими БАВ, как альфа-изоспареин, 4-меркапто-4-метил-2-пентанон, 11,12-дегидроспартеин и диметиловый эфир 1,4-бензолдикарбоксимовой кислоты.

Синеголовник приморский (*Eryngium maritimum*) обогащен ледолом, спатуленолом, 9-кадинен-15-олом, 12-олеанен-3,22,28-триолом, а лекарственное растение гудайера ползучая (*Goodyera repens*) богата веществами – рутин, гудеерин, кемпферол-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-рутинозид.

Установлено, что ладьян трехнадрезанный (*Corallorhiza trifida*) содержит в своем составе следующие БАВ: апигенин, антоциан-2,4-О-дигликозид, кверцетин, а лекарственное растение тайник сердцевидный (*Listera cordata*) богат лютеолин 3,4'–диглюкозидом, кверцетином, 3,3',4',7–тетрагидроксифлавононом; в лекарственном растении палыдекорник пятнистый (*Dactylorhiza inaculata*) доминируют такие биологически активные вещества, как рутин, кверцетин, 3,3',4',5,5',7–гексагидроксифлавонон, 3,3',4',5,5',7–гексагидроксифлавонон-3-О-гликозид, галловая кислота, феруловая кислота, а в лекарственных растениях любка зеленоцветковая (*Platanthera chlorantha*) и любка двулистная (*P. bifolia*) обнаружены такие индивидуальное вещества, как сантолинатриен, 1,2–гександиол-2-бензоат, 3,7-диметил-1,3,6-октатриен, 3,7-диметил-2,6-октадиен-1-ол, бензил ацетат, сиреневый спирт, сиреневый альдегид. Соединение 3-карен обнаружено только у лекарственного растения любка зеленоцветковая (*Platanthera chlorantha*).

Исследованные лекарственные растения содержат в своем составе микроэлементы: фосфор, калий, кальций, натрий, магний, серу. Наибольшее количество магния, кальция, калия содержится в лекарственном растении скумпия кожевенная (*Cotinus coggygria*). Максимальное содержание натрия отмечено у лекарственного растения синеголовник приморский (*Eryngium maritimum*). Лекарственные растения любка зеленоцветковая (*Platanthera chlorantha*) и любка двулистная (*P. bifolia*) характеризуются высоким содержанием серы и низким содержанием фосфора. Аналогичное низкое содержание фосфора отмечено у лекарственного растения тайник сердцевидный (*Listera cordata*). Высокое содержание фосфора (2410,8 мг/кг сухого вещества) определено у лекарственного растения палыдекорник пятнистый (*Dactylorhiza inaculata*).

Заключение

Исследованные лекарственных растений Калининградской области содержат большое количество органических кислот алифатического ряда,

таких как янтарная кислота, бензойная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, щавелевая кислота, винная кислота, а также водорастворимые витамины, такие как аскорбиновая кислота, рибофлавин, тиамин.

Список литературы

1. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry / W. Windisch, K. Schedle, Ch. Plitzner, A Kroismayr // *Journal of Animal Science*. – 2008. – Vol. 86. – P. 140–147.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАПИТКИ ИЗ ДИКОРОСОВ

М. В. Ефанов, А. А. Сеницын, В. В. Коньшин

*ООО «МИП «Югра-Биотехнологии»,
628011, Ханты-Мансийск, ул. Студенческая, д. 27, Россия; e-mail: efanov_1973@mail.ru*

В настоящее время актуально получение функциональных бионапитков с применением новых способов переработки. Разработан способ кавитационной модификации растительного сырья для его переработки в физиологически активные напитки [1]. Интересным функциональным бионапитком выступает кедровое молочко, содержащее липидный белково-углеводный комплекс кедровых орехов и обладающее некоторыми биологически ценными свойствами [2, 3]. Разработана ультразвуковая технология получения кедрового молока [4]. Нами разработан новый метод малоотходной низкотемпературной переработки плодов и ягод в консервы путем их кавитационной обработки в воде [5]. Нами разработаны новые кавитационные методы получения ягодно-ореховых и медово-ягодно-ореховых напитков на основе ягод и кедровых орехов с добавлением сахара или мёда, а также травы стевии, позволяющие получить бионапитки, сочетающие в себе полезные свойства ягод и ядер кедрового ореха, обладающие высокой физиологической активностью за счет свойств мёда, а также предлагается новый медово-травяной напиток на основе травы кипрея обыкновенного (Иван-чай) [5].

Цель работы – изучение химического состава и биохимических свойств функциональных напитков из различных дикоросов, полученных в условиях кавитационной обработки.

Материалы и методы

Получение функциональных напитков из дикоросов по кавитационной технологии проводили следующим образом: в кавитационный аппарат добавляют воду и вносят ягоды клюквы и ядра кедровых орехов в различных массовых соотношениях. Затем смесь ингредиентов в водной среде подвергают интенсивному кавитационному воздействию в кавитационном аппарате при температурах от 50 до 70 °С в течение от 30 до 60 минут с получением функционального напитка [5]. Бактериологическое исследование продукта проводили в день приготовления, на второй, пятый день и через 3 недели. Хранение ягодно-орехового напитка осуществлялось в бытовом холодильнике при температуре +2–4 °С. Для определения эффективности применения полученного функционального ягодно-орехового напитка проведено клиническое биохимическое исследование на 30 здоровых добровольцах, которые в течение 30 дней ежедневно употребляли в пищу 200 мл свежеприготовленного ягодно-орехового напитка.

Результаты

Изучены биохимические показатели липидного спектра крови: холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, коэффициент атерогенности. Следует отметить, что все исследуемые показатели были в пределах нормальных значений, тем не менее, были зарегистрированы положительные изменения их липидного статуса. Для улучшения вкуса, аромата и биологической ценности в состав заявляемого напитка вместо сахара (подсластитель) нами предложено добавлять мёд. При этом получается инновационный высокоэффективный функциональный медово-ягодно-ореховый напиток, с повышенной биологической активностью, который сочетает в себе полезные свойства мёда, ягод и кедрового ореха [5]. При этом получение медового ягодно-орехового напитка осуществляли следующим образом. Для этого в качестве сырья применяли свежие или замороженные ягоды клюквы или брусники и очищенные ядра кедрового ореха, а также натуральный мёд [5]. В кавитационный аппарат наливали воду и вносили мёд, ягоды клюквы и ядра кедровых орехов при следующих массовых соотношениях (из расчета на 100 массовых частей получаемого напитка):

Ягоды	10–15
Ядра кедрового ореха	10–15
Мёд	5–10
Вода	75–60

Затем полученную композицию в водной среде подвергают кавитационному воздействию в кавитационном аппарате при температуре от 50 до 70 0С в течение 30–60 минут с последующей упаковкой продукта в герметичную тару. Кроме того, нами был разработан новый способ получения медового безалкогольного газированного напитка на основе травы кипрея с добавкой в качестве консерванта сравнительно малотоксичного сорбата калия [5]. Полученный новый безалкогольный газированный напиток содержит натуральный мед, водный экстракт кипрея, лимонную кислоту и сорбат калия, при соответствующих массовых соотношениях ингредиентов [5]:

Мед	67,5–73,0 кг
Лимонная кислота	1,25–1,50 кг
Иван-чай (кипрей)	7,0–10,0 кг
Сорбат калия	0,1–0,15 кг
Вода	24,15–15,35

Для усиления вкуса, появления нового аромата и повышения физиологической ценности в состав разработанного функционального бионапитка вместо сахарозы добавляют натуральный цветочный мед. В ходе анализа содержания липидов в сыворотке крови было выявлено, что на фоне применения ягодно-орехового напитка достоверно снижается уровень общего холестерина и ЛПНП уже через 4 недели употребления про-

дукта. Таким образом, атерогенный эффект при употреблении в пищу ягодно-орехового напитка, вероятно, обусловлен высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот в кедровых орехах. В этой связи употребление ягодно-орехового напитка возможно рекомендовать лицам с гиперхолестеринемией и имеющим высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний в качестве профилактики. Далее изучалось воздействие применения ягодно-орехового напитка на показатели витаминного и антиоксидантного статуса. Так, витамин Е, витамин А и аскорбиновая кислота (витамин С) являются наиболее известными антиоксидантами. По результатам проведенного исследования у респондентов при ежедневном применении ягодно-орехового напитка наблюдалось уже через 2 недели достоверное повышение уровня витаминов А и Е в плазме крови, витамина С – к концу периода наблюдения. При этом показатели оксидативного стресса – гидропероксиды липидов достоверно снижались по сравнению с их исходными значениями.

Заключение

Получен и исследован ягодно-ореховый бионапиток в условиях кавитационной обработки. Показано, что применение полученного бионанонапитка в составе рациона здоровых испытуемых позволяет усилить общую антиоксидантную активность организма, что приводит к ослаблению действия природно-климатических факторов среды.

Список литературы

1. Ярмаркин Д. А., Прохасько Л. С., Мазаев А. Н., Асенова Б. К., Зинина О. В., Залилов Р. В. Кавитационные технологии в пищевой промышленности. // Молодой ученый. 2014. № 8. С. 312–315.
2. Кущин А. А., Федотов В. А. Способ получения кедрового молочка. // Патент РФ № 2311037. Оpubл. 27.11.2012. Бюлл. № 12.
3. Бадеников А. В., Ульянов Б. А., Семенов И. А., Свиридов Д. П. Способ получения кедрового молока. // Патент РФ № 2461205. Оpubл. 20.09.2012. Бюлл. № 26.
4. Свиридов Д. П. Ультразвуковое измельчение материалов в производстве молока кедрового: автореф. дисс. ... канд. техн. наук. Томск, 2011. 20 с.
5. Ефанов М. В. Технология получения медовых ягодно-ореховых напитков. // Материалы XI Международной научно-практической конференции «Пищевая промышленность и агропромышленный комплекс: достижения, проблемы, перспективы». Пенза: Издательство Приволжского дома знаний, 2019. С. 15–17.

К ВОПРОСУ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТОЛИЗОМ ЛУЗГИ ГРЕЧИХИ МЕЛАНИНА В КОНДИТЕРСКИХ ПОЛУФАБРИКАТАХ

Е. А. Кадрицкая, М. Н. Школьников

ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»,
620144, РФ, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45, Россия;
e-mail: shkolknikova.m.n@mail.ru

Кондитерские изделия присутствуют в ежедневном рационе практически каждого человека. Поэтому повышение их биологической ценности является актуальной задачей отрасли. При этом один из путей ее решения – добавление в состав изделий и/или кондитерских полуфабрикатов функциональных ингредиентов, что способствует, зачастую, и снижению себестоимости изделий за счет сокращения в составе дорогостоящего импортного сырья, в частности, продуктов переработки какао-бобов – какао-масла и какао-порошка. Надо сказать, что заменители какао-масла (эквиваленты и альтернативы) как более доступные сырьевые компоненты длительное время используются при производстве многих кондитерских изделий и полуфабрикатов. Что касается какао-порошка, то на сегодняшний день частичная или полная его замена в рецептурах кондитерских изделий исследована в эксперименте, производственная применимость которых неизвестна. Так, использование кэроба в рецептурах мучных кондитерских изделий описано в исследованиях [1, 2].

Продукты переработки зерна гречихи посевной *Fagopyrum esculéntum*, в частности, имеющая производственный потенциал лузга, также используются в рецептурах кондитерских изделий [3]. В патенте РФ 2545349 предложен способ получения гидролизата из шелухи гречихи в качестве замены какао-порошка для пряничных и кондитерских изделий; из патента РФ 2747688 известен способ использования пищевого пигмента-красителя из лузги гречихи, включающий меланин, в рецептуре десерта – крема из ягод жимолости; авторы патента РФ 2546175 предлагают способ получения гидролизата из лузги гречихи и его использование в технологии шоколадной глазури.

Цель исследования – обоснование использования выделенного из лузги гречихи посевной водорастворимого меланина в рецептуре кондитерского полуфабриката – глазури. По химической структуре меланины являются длинноцепочечными полимерами с большим молекулярным весом и сложной кристаллической структурой, близкой к карамельным красителям (колерам) с индексом E-150.

Материалы и методы

Образец меланина выделен из лужги гречихи посевной сорта Девятка репродукция РС-2 – ЭС (Красноуфимский район Свердловской области) по известной схеме [4]. Выход меланина составил 14 %.

Результаты

По внешнему виду образец меланина – мелкодисперсный порошок темно-коричневого цвета, без вкуса и запаха. Влажность образца 5,2 % ($\pm 0,80$), зольность 7,4 % ($\pm 1,0$), *pH* 5,5 ед. рН. Согласно ГОСТ 108-2014, полученные значения физико-химических показателей соответствуют требованиям к качеству производственного какао-порошка, что свидетельствует о технологической адекватности исследуемого сырьевого компонента для производства кондитерского полуфабриката. Установлена способность образца меланина связывать ионы меди и наличие антиоксидантной активности. Это делает целесообразным продолжить изучение технологических свойств полученного меланина, включая определение плотности, степени измельчения, влаго- и жиродерживающей способности и др.

Заключение

Полученный образец меланина по изученным показателям можно рекомендовать в качестве комплексной пищевой добавки – пищевого красителя, антиоксиданта и биосорбента, в составе кондитерской глазури.

Список литературы

1. Сычева, О. В. Мучное кондитерское изделие с заменителем какао / О. В. Сычёва, Е. А. Скорбина, Э. Д. Алтунян // Пищевая индустрия. – 2019. – № 4. – С. 38–40.
2. Лукина, С. И. Применение нетрадиционного сырья в производстве бисквитно-сбивного печенья / С. И. Лукина, Е. И. Пономарева, И. П. Пешкина, Х. Ю. Боташева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2018. – № 1. – С. 56–59.
3. Заболотная, А. М. Некоторые аспекты комплексной технологии переработки лужги гречихи / А. М. Заболотная, Л. А. Лим, В. А. Реутов, А. В. Ануфриев [и др.] // Вестник Югорского государственного университета. – 2015. – № S2(37). – С. 99–101.
4. Школьникова, М. Н. Обоснование использования лужги гречихи для получения функциональных пищевых красителей / М. Н. Школьникова, Е. А. Кадрицкая // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2020. – № 4. – С. 22–28.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МХОВ И ЛИШАЙНИКОВ

А. Ю. Лапо

Сибирский федеральный университет,
Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79; e-mail: nastyal.lapo@yandex.ru

Появление устойчивых к антибиотикам патогенов является серьезной глобальной угрозой для здоровья. Следовательно, поиску новых антибиотиков из различных природных источников следует уделять первоочередное внимание. Лишайники и мхи производят различные низкомолекулярные метаболиты, которые используются в традиционной медицине на протяжении веков. В лишайниках обнаружены некоторые витамины и полезные для организма человека кислоты. Усниновая кислота эффективна против штаммов грамположительных бактерий, включая мультирезистентные штаммы *Streptococcus aureus*, энтерококков и микобактерий [1]. Паракановые кислоты проявляют антибиотическую активность и противоопухолевые свойства [2]. Экстракты мхов проявляют антибактериальную и противогрибковую активность [3], а также антиоксидантную и противоопухолевую [4]. Результаты многих исследований указывают, что мхи и лишайники являются хорошими кандидатами для поиска новых активных фармацевтических соединений.

Цель работы – изучение антибиотических свойств экстрактов мхов и лишайников в отношении тест-культур бактерий.

Материалы и методы

Сбор образцов мхов и лишайников проводили в районе национального парка «Красноярские Столбы». Для приготовления водных и спиртовых экстрактов использовали сухие навески по 1 г на 10 мл экстракта. Определение антибактериальной активности полученных экстрактов проводили диско-диффузионным методом [5] в отношении тестовых культур бактерий видов *Micrococcus luteus*, *Bacillus mycoides*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 1). В качестве контроля использовали диски, пропитанные раствором этанола и подсушенные на воздухе (70 %).

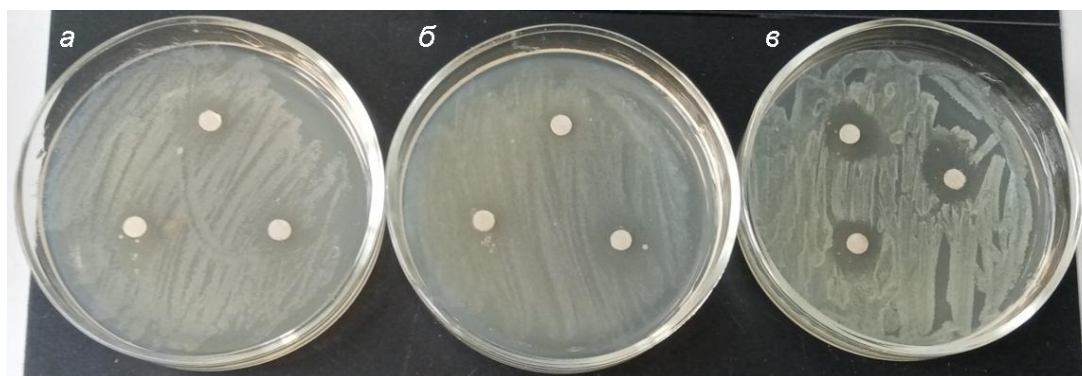


Рис. 1. Зоны отсутствия роста бактерий *P. aeruginosa* (а), *B. mycoides* (б), *E. coli* (в) вокруг дисков, пропитанных спиртовым экстрактом *Lobaria isidiophora*

Результаты

В районе национального парка «Красноярские столбы» были собраны и идентифицированы 4 вида мхов и 3 вида лишайников, относящихся к следующим видам: мхи – апомецгерия опушенная (*Metzgeria pubescens*), плагиомниум густозубчатый (*Plagiomnium confertidens*), абиединелла пихтовидная (*Abietinella abietina*), туидиум Филибера (*Thuidium assimile*); лишайники – лобария изидиеносная (*Lobaria isidiophora*), уснея (*Usnea sp.*) и пармелия (*Parmelia sp.*).

Экстракты уснеи показали высокую антимикробную активность в отношении видов *B. mycoides* и *M. luteus*, зоны отсутствия роста для спиртового экстракта составили от 28 до 37 мм, для и водного – от 14 до 22 мм (рис. 2). Экстракты лобарии изидиеносной проявили среднюю активность в отношении *P. aeruginosa*, *B. mycoides* и *M. luteus*, зоны отсутствия роста составляли от 9 до 18 мм. Экстракт пармелии проявил слабую активность в отношении *E. coli*. Среди мхов слабая активность обнаружена для экстракта апомецгерии опушенной в отношении *B. mycoides*. Экстракты остальных исследуемых видов мхов – плагиомниума густозубчатого, абиединеллы пихтовидной и туидиума Филибера – не проявили активности в отношении тестируемых культур бактерий.

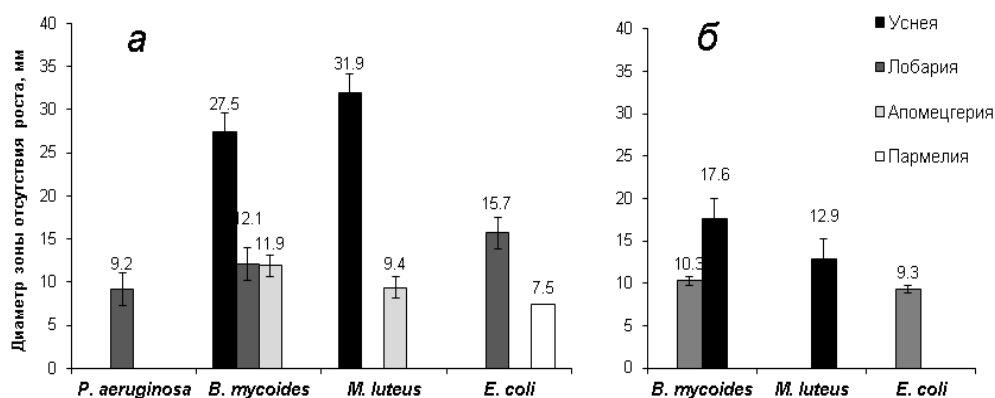


Рис. 2. Активность спиртовых (а) и водных (б) экстрактов уснеи, лобарии, апомецгерии и пармелии в отношении тестовых бактерий

Среди всех использованных спиртовых экстрактов наибольшую активность проявлял экстракт уснеи. Зоны отсутствия роста бактерий были в 2 раза больше, чем у экстракта лобарии и в 2–3 раза больше, чем у экстракта апомецгерии. Активность водных экстрактов была значительно слабее, чем спиртовых, ни один водный экстракт не проявил антимикробной активности в отношении *P. aeruginosa*.

Заключение

Спиртовые экстракты уснеи, лобарии и апомецгерии проявили антибактериальную активность в отношении тестовых культур бактерий и могут быть использованы в качестве источника антимикробных препаратов.

Список литературы

1. Cocchiello M. et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound // *Naturwissenschaften*. – 2002. – V. 89. – №. 4. – P. 137-146.
2. Bandichhor R., Nosse B., Reiser O. Paraconic acids – the natural products from lichen symbiont // *Natural Product Synthesis I*. – 2004. – P. 43-72.
3. Negi K., Chaturvedi P. In vitro antimicrobial efficacy of *Rhynchostegium vagans* A. Jaeger (moss) against commonly occurring pathogenic microbes of Indian sub-tropics // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 10-14.
4. Onbasli D., Yuvali G. In vitro medicinal potentials of *Bryum capillare*, a moss sample, from Turkey // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2021. – V. 28. – №. 1. – P. 478-483.
5. Лабинская А. С. и др. Руководство по медицинской микробиологии. – М.: Бином, 2008. – С. 342-362.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У *PINUS PUMILA*

И. С. Шевелева

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

Pinus Pumila является экономически ценным видом хвойных растений. Для того чтобы восстановить и расширить ресурсы кедрового стланика и в полной мере реализовать экологические функции и экономическую ценность данного вида, искусственное лесоразведение чрезвычайно важно. Традиционный метод размножения *Pinus Pumila* – это в основном семенное размножение. Однако из-за небольшого источника кедрового стланика, длительного цикла роста, физиологических характеристик покоя семян *Pinus Pumila* и результата половой рекомбинации семян каждая особь имеет уникальный геном, поэтому традиционные методы размножения не могут соответствовать требованиям искусственного облесения [1]. Для того чтобы в кратчайшие сроки осуществить крупномасштабную селекцию кедрового стланика, очень важна разработка и применение технологии соматического эмбриогенеза [2]. Разработка биотехнологии соматического эмбриогенеза *in vitro* у хвойных позволяет не только массово тиражировать элитные генотипы хвойных, но и служит модельной системой для изучения физиолого-биохимических, молекулярно-генетических и эмбриональных процессов закономерностей эмбриогенеза [3].

Цель работы – получение и цитоэмбриологическое исследование соматических зародышей кедрового стланика.

Материалы и методы

Материалом для индукции соматического эмбриогенеза служили изолированные незрелые зиготические зародыши *Pinus Pumila* на предсемядольной стадии развития, собранные с единичных деревьев, произрастающих на территориях Иркутской области Бодайбинского района и Чукотского автономного округа. Собранные семена очищались от покровных чешуй. Перед посадкой проводилась стерилизация растительного материала в ламинар-боксе после обработки гипохлоридом натрия. После стерилизации материал тщательно промывался стерилизованной водой (3 раза) [4]. Экспланты вводились на питательные среды *DCR-NAA* и *DCR*. Экспланты выдерживались в темноте, при температуре 25 °С, продолжительность культивирования 4–6 недель. В качестве регуляторов роста использовались нафталинуксусная кислота [*NAA*] (2 мг/л), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2 мг/л) и 6-бензиладенин [*6-BA*] (1 мг/л).

Результаты

При инокуляции зиготических зародышей на питательные среды формировался плотный или рыхлый каллус белого цвета. Проведение цитологического анализа показало, что каллус представлен двумя типами клеток – крупными вытянутыми эмбриональными трубками (рис. 1, А) и округлыми клетками, формирующими глобулы (рис. 1, Б). Также в рыхлом каллусе были обнаружены эмбриониды (рис. 2). Данные эмбриониды характерны как для зиготических, так и для соматических зародышей хвойных видов растений на стадиях раннего эмбриогенеза. Через 9 месяцев культивирования на пролиферационных средах *DCR-NAA* и *DCR* жизнеспособность каллусов сохранялась у 35 %, также наблюдалось формирование глобул соматических зародышей.

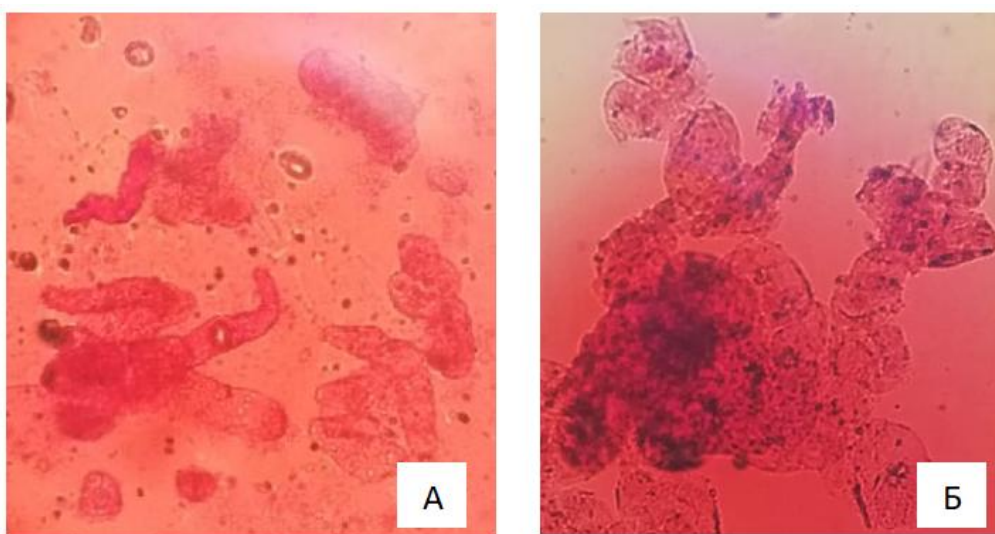


Рис. 1. Цитологический анализ каллусных культур *Pinus Pumila* (А – удлиненные клетки каллусных культур; Б – округлые клетки, формирующие глобулы)

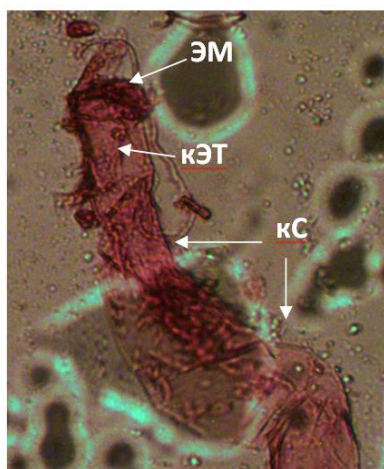


Рис. 2. Зародышеподобная структура, состоящая из клеток эмбриональной массы (ЭМ), клеток типа эмбриональных трубок (кЭТ) и клеток суспензорного типа (кС).
Масштаб 50 мкм

Заключение

В результате данного эксперимента удалось получить эмбриогенный каллус, соматические зародыши и эмбриониды из незрелых зиготических зародышей кедрового стланика. При воздействии гормонов нафталинуксусной кислоты, 2,4-дихлорфеноксиксусной кислоты и 6-бензиладенина, полученные соматические зародыши *Pinus Pumila* имели способность к дифференцированию и переходу в эмбриогенное состояние. В итоге данного исследования была получена эмбрионально-суспензорная масса, состоящая из клеток способных пролиферировать и образовывать соматические зародыши.

Список литературы

1. Song Y., Zhu J. J., Yan Q. L. (2020) The temperature and length for the release of primary and induction of secondary physiological dormancy in Korean pine (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) seeds. *New Forest* 51(4):657–669
2. Kim Y. W., Heung K. M. (2014) Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese red pine (*Pinus densiflora*). *Plant Biotechnol Rep* 8(3):259–266.
3. Li X, Liu X. T., Wei J. T., Li Y., Tigabu M., Zhao X. Y. (2020) Genetic Improvement of *Pinus koraiensis* in China: current situation and future prospects. *Forests* 11(2):148.
4. Третьякова, И. Н. Продуктивность эмбриогенных клеточных линий и их соматическая изменчивость у лиственницы сибирской *in vitro* / И. Н. Третьякова, А. С. Иваницкая, М. Э. Пак // Журнал «Лесоведение». – 2015. – № 1.

ФИТОПЛАНКТОН – ПОКАЗАТЕЛЬ КАЧЕСТВА ВОДЫ АБАКАНСКОЙ ПРОТОКИ РЕКИ ЕНИСЕЙ

Д. В. Кособуко

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

Актуальная проблема XXI века – проблема экологического состояния водных объектов. Мощнейший антропогенный пресс на водоемы нарушает исторически сложившееся равновесие и ведет к ухудшению качества воды [1, 2]. Изменение среды приводит к изменению структурных и функциональных показателей сообщества организмов водного объекта [3, 4]. Под действием антропогенных факторов меняется разнообразие, структура сообщества, трофические взаимодействия и продуктивность водных экосистем [4]. Микроводоросли первыми вступают в контакт с загрязнениями, поэтому их считают хорошими биологическими индикаторами качества воды [2].

В последнее время одной из экологических проблем в г. Красноярске является массовое развитие зеленых водорослей рода *Spirogyra* и высших водных растений в Абаканской протоке р. Енисей. Это привело к негативным явлениям, проявляющихся в ухудшении запаха, микробиологических параметров воды, заиливании дна, приведших к тому, что Абаканская протока стала терять рекреационные качества и свойства.

Цель работы – изучение структуры фитопланктона Абаканской протоки реки Енисей при воздействии антропогенного фактора. Объектом исследования служил фитопланктон Абаканской протоки. С мая по август 2020 года было отобрано 20 проб фитопланктона на 4 станциях (рис. 1) с разной степенью влияния антропогенных факторов.



Рис. 1. Расположение Абаканской протоки и станций отбора проб

Объекты и методы

Абаканская протока реки Енисей (55°59' с. ш., 92°51' в.д.) расположена в центре г. Красноярска между островом Отдыха и правым берегом. В верхней части русло протоки перекрывает дамба, по которой проходит автомобильная дорога. Возле правого берега через дамбу проложены две трубы, обеспечивающие частичный пропуск воды между верхней и основной частями протоки. Ниже по течению в нескольких местах расположены искусственные насыпи, представляющие собой защитный слой грунта проходящих по дну протоки дюкеров. Возле одной из таких насыпей организовано рыборазводное хозяйство и установлены садковые линии для выращивания и выдерживания рыбы. В центральной части Абаканской протоки у правого берега через рассеивающий выпуск осуществляется сброс тёплой технологической воды ТЭЦ-2. Кроме того, в нескольких местах в протоку поступают городские ливневые стоки.

Результаты

За вегетационный период в видовой структуре фитопланктона выявлено 78 таксонов на уровне вида и ниже, относящихся к 7 разным отделам, из которых на отдел *Bacillariophyta* приходилось 59 % (44 вида), *Chlorophyta* – 20,5 % (18), *Cyanobacteria* – 7,7 % (6), *Euglenophyta* – 3,8 % (4), *Chrysophyta* – 5,1 % (3), *Dinophyta* – 2,6 % (2), *Cryptophyta* – 1,3 % (1). Такое соотношение отделов характерно для альгофлоры водоемов субарктики.

Величины индекса видового разнообразия были значительными и изменялись по станциям и месяцам в пределах 1,74–3,86 бит, где максимальное среднее значение принадлежало станции 1 (фоновая) – $3,24 \pm 0,14$ бит, а минимальное – станции 2 ($1,9 \pm 0,07$ бит). В целом богатое видовое разнообразие по станциям свидетельствовало о благоприятных условиях для развития фитопланктона. В основном, фитопланктон носил диатомовый характер для большинства станций, так как большая часть доминирующих видов, как по численности, так и по биомассе, представляли диатомовые водоросли. Однако нередко в ранг доминантов выходили другие водоросли: зеленая водоросль *Ulothrix zonata* (F. Weber & Mohr) Kütz. доминировала на станции 1, а *Spirogyra* sp. – на станции 4 в мае; золотистые водоросли рода *Dinobryon* преобладали на станции 2 с мая по июль.

Показатели индекса Чекановского-Сьеренсена, характеризующие сходство видового состава, по станциям значительно варьировали от 0 до 0,5, в среднем составлял 0,4. Таким образом, значительного сходства видового состава не обнаружено, то есть на каждой станции формировалась собственная видовая структура фитопланктона, которая зависела, скорее всего, от влияющих экологических факторов по станциям.

Количественные показатели, представленные в виде численности и биомассы фитопланктона, также были неоднородны как по станциям, так и в течение вегетационного периода (рис. 2).

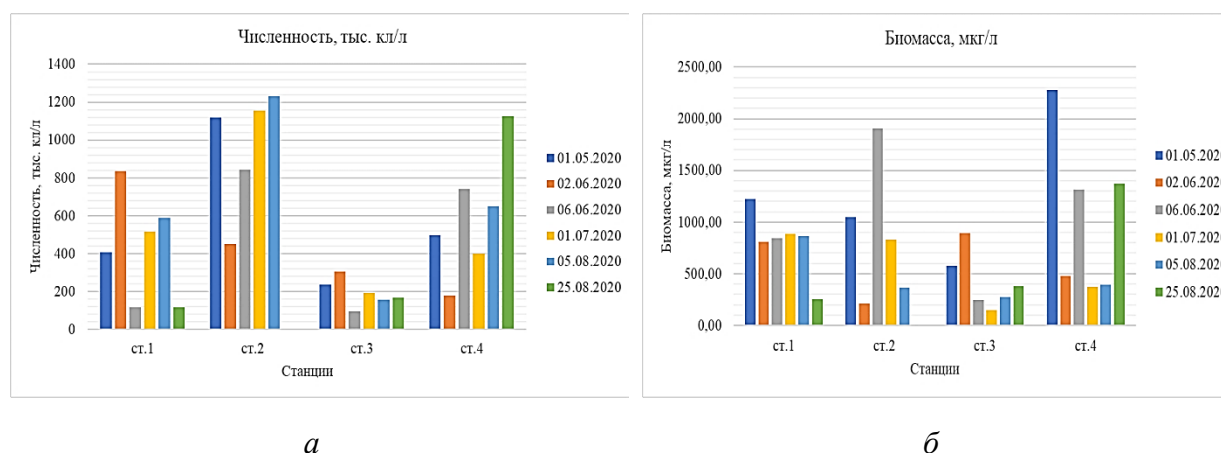


Рис. 2. Численность (а, тыс. кл./л) и биомасса (б, мкг/л) фитопланктона Абаканской протоки р. Енисей, май-август 2020

Наибольшая средняя величина численности составила $959,626 \pm 143,5$ тыс. кл/л на станции 2, а наименьшая - $192,58 \pm 29,87$ тыс. кл/л на станции 3. В целом численность сильно менялась и зависела от времени вегетационного периода и места положения станции. Определяющую роль в формировании численности играли диатомовые и золотистые водоросли. Наибольшая средняя биомасса отмечена на станции 4 ($1036,03 \pm 310,18$ мкг/л), куда по течению могли сноситься метаболиты и корма от садкового хозяйства, расположенного выше. Средняя наименьшая биомасса зарегистрирована на станции 3 ($419,52 \pm 111,48$ мкг/л), возможно это связано с повышенными температурами воды, поступающие с ТЭЦ-2.

Заключение

Основной вклад в формирование биомассы вносили диатомовые, золотистые и зеленые водоросли. В сезонной динамике общей численности и биомассы по станциям выявили следующие закономерности: самые низкие величины плотности фитопланктона в течение всего вегетационного периода обнаружены на станции 3; сезонная динамика численности имела тенденцию снижения с мая до середины июня, затем плавное увеличения к концу августа. Таким образом, в сезонной динамике развития фитопланктона установлено два пика развития водорослей, с депрессией фитопланктона в середине июня.

В 2020 году качество вод Абаканской протоки по показателям сапробности фитопланктона изменялось в пределах 1,57–2,00 баллов и соответствовала II классу степени загрязненности вод «слабозагрязненная». Лишь в отдельные даты (май, середина июня) на станции 1 и станции 3 качество вод было выше и соответствовало I классу, степени загрязненности вод «условно чистая».

Список литературы

1. Bunn S. E., Arthington A. H. Basic principles, and ecological consequences of altered flow regimes for aquatic biodiversity // Environmental Management – 2002. – Vol. 30(4). – P. 492–507.

2. Дрозденко Т. В. Фитопланктон как индикатор экологического состояния водоема (на примере озера Барское, Псковская область) // Изд. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. – Т. 18. – Вып. 2. – С. 225–231.

3. Чуйков Ю. С., Бухарицин П. И., Киселева Л. А., Фильчаков В. А., Сапрыкин В. Н., Лабунская Е. Н. Гидролого-гидробиологический режим нижней Волги // Экология Астраханской области. 1996. – Вып. 4. – 253 с.

4. Корнева Л. Г. Фитопланктон водохранилищ бассейна Волги / под ред. А. И. Копылова. Кострома: Костромской печатный дом. 2015. 284 с.

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ 1. ПОЛИМЕРЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ ИЗДЕЛИЯ (ПРОЦЕССИНГ).....	5
<i>Dufresne A.</i> BIOBASED NANOMATERIALS AND POLYMER NANOCOMPOSITES.....	6
<i>Gomes de Souza Júnior F.</i> BIOPOLYMERS AND SENSORS LAB EFFORTS TO SPREAD UP THE USE OF BIOPOLYMERS.....	8
<i>Штильман М. И.</i> БИОМАТЕРИАЛЫ – ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ.....	17
<i>Tsuge T.</i> MICROBIAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY RECOMBINANT BACTERIA.....	19
<i>Gutschmann B., Santolin L., Neubauer P., Junne S., Riedel S. L.</i> PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGIES FOR ENHANCED POLYHYDROXYALKANOATE BIOPLASTIC PRODUCTION FROM LIPID BASED BIOGENIC WASTE STREAMS.....	22
<i>Жила Н. О., Васильев А. Д., Киселев Е. Г.</i> СВОЙСТВА РАЗРУШАЕМЫХ ПГА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ ШТАММОМ CUPRIAVIDUS NECATOR IBP-21 НА РАЗЛИЧНЫХ С-СУБСТРАТАХ.....	24
<i>Жила Н., Сапожникова К.</i> СИНТЕЗ РАЗРУШАЕМЫХ ПГА НОВЫМ ШТАММОМ CUPRIAVIDUS NECATOR IBP-21 НА РАЗЛИЧНЫХ С-СУБСТРАТАХ.....	28
<i>Zhila N., Sapozhnikova K.</i> CUPRIAVIDUS NECATOR B-10646 GROWTH AND POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION ON DIFFERENT PLANT OILS.....	33
<i>Волков В. В., Жила Н. О., Мустафин А. С., Киселев Е. Г.</i> ЖИРОСОДЕРЖАЩИЕ ОТХОДЫ РЫБОКОНСЕРВНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ СИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ.....	37
<i>Volova T., Kiselev E., Dudaev A., Nemtsev I., Lukyanenko A., Sukovatyi A., Ryltseva G., Shishatskaya E.</i> PROPERTIES OF FILMS FROM DEGRADABLE PHAS OF DIFFERENT MONOMER COMPOSITIONS.....	40
<i>Жила Н., Сапожникова К., Немцев И.</i> МИКРОСТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПЛЕНОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПГА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НОВЫМ ШТАММОМ С. NECATOR IBP-21 НА РАЗЛИЧНЫХ С-СУБСТРАТАХ.....	45

<i>Алешина Л. А., Гладышева Е. К., Будаева В. В., Скиба Е. А., Сакович Г. В.</i> СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРОВАННОЙ ПРОДУЦЕНТОМ КОМАГАТАЕИВАСТЕР ХУЛИНУС В-12431 НА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ МИСКАНТУСА И ШЕЛУХИ ОВСА.....	49
<i>Volova T. G., Golubev A. I., Nemtsev I. V., Lukyanenko A. V., Dudaev A. E., Shishatskaya E. I.</i> LASER PROCESSING OF POLYMER FILMS FABRICATED FROM PHAs DIFFERING IN THEIR MONOMER COMPOSITION.....	51
<i>Писаренко А. В., Колымагин Д. А., Буркатовский Д. С., Чубич Д. А.</i> ПОЛИМЕРНЫЕ 3D-МИКРОСТРУКТУРЫ В БИОЛОГИИ: ОТ МИКРООПТИКИ ДО КЛЕТОЧНЫХ КАРКАСОВ.....	55
<i>Кустерский К. А., Демиденко А. В., Киселев Е. Г., Барановский С. В., Васильев А. Д., Суковатый А. Г., Шишацкая Е. И.</i> БИОПОЛИМЕР П(ЗГБ-СО-ЗГВ) ДЛЯ 3D-БИОПЕЧАТИ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ПОСЛОЙНОГО НАПЛАВЛЕНИЯ МАТЕРИАЛА.....	58
<i>Дудаев А. Е., Турчин В. И.</i> ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНОК ИЗ ПГА РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА.....	63
<i>Алехова Т. А., Загустина Н. А., Новожилова Т. Ю., Александрова А. В., Башаров А. А., Плотников А. Д.</i> РАЗРАБОТКА НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КУПИРОВАНИЯ БИОКОРРОЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ГЕРМОЗАМКНУТОГО ОБЪЕМА МКС (МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ).....	67
РАЗДЕЛ 2. ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИТЫ.....	69
<i>Joseph K.</i> A BRIEF REVIEW ON ELECTROSPUN LIGNIN NANOFIBERS.....	70
<i>Rajakumari R., Oluwafemi O. S., Rajeshkumar S., Thomas S., Kalarikkal N.</i> NANOFORMULATED PROANTHOCYANIDINS AS AN EFFECTIVE WOUND HEALING COMPONENT.....	72
<i>Jose C., Han Chan C., Winie T., Joseph B., Tharayil A., Maria H. J., La Mantia F. P., Rouxel D., Morreale M., Laroze D., Mathew L., Thomas S.</i> THERMOMECHANICAL ANALYSIS OF ISORA NANOFIBRIL INCORPORATED POLYETHYLENE NANOCOMPOSITES.....	76
<i>Rakhimol K. R., Thomas S., Kalarikkal N., Jayachandran K.</i> CASEIN STABILIZED METAL AND METAL OXIDE NANOPARTICLES FOR THE EFFICIENT IN VITRO CULTURING OF SCOPARIA DULCIS L.....	80
<i>Thomas S., Baranovsky S. V., Kiselev E. G., Kuzmin A. P., Avinash R. P.</i> THERMAL AND MECHANICAL STUDIES OF BIOFILLER BASED POLY-3- HYDROXYBUTYRATE BIOCOSCOMPOSITES.....	85

<i>Aghamirzeyeva C. S., Mashayeva S. S., Mamedova N. A.</i> CELLULOSE-BASED BIOMIMETIC SUPERHYDROPHOBIC SURFACES: OVERVIEW.....	90
<i>Липайкин С., Шишацкая Е.</i> ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОНИЗИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРСОДЕРЖАЩЕГО ОЗОНИДА НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА.....	93
<i>Dorokhin A.</i> POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) BASED NANOPARTICLES AS A DELIVERY PLATFORM FOR CURCUMINOIDS EXTRACTED FROM CURCUMA LONGA.....	96
<i>Стрельцова Н. В., Демьянчук Д. А.</i> ВЛИЯНИЕ ДЕПОНИРОВАННЫХ ФОРМ ФУНГИЦИДОВ НА ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.....	99
РАЗДЕЛ 3. ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ И ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	102
<i>Fernandes S.</i> MARINE BIO-INSPIRED MATERIALS THAT MAKE A POSITIVE CONTRIBUTION TO THE MITIGATION OF CLIMATE CHANGE AND THE SUSTAINABLE USE OF NATURAL RESOURCES.....	104
<i>Poncelet D.</i> MICROENCAPSULATION: A HUMAN STORY.....	106
<i>Smet B. D., Poncelet D.</i> ENCAPSULATION USING DRIPPING: FROM FUNDAMENTAL TO INDUSTRIAL PRODUCTION.....	109
<i>Hasirci V.</i> BIOMATERIALS AS TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS, TISSUE MODELS AND DIAGNOSTIC DEVICES.....	112
<i>Docea A. O., Calina D., Tsitsimpikou Ch., Neagu M., Gofita E., Tsatsakis A.</i> A NEW PROTOCOL FOR RISK ASSESSMENT OF LONG TERM LOW DOSES EXPOSURE TO COMPLEX MIXTURES OF PESTICIDES.....	115
<i>Salmina A. B., Malinovskaya N. A., Salmin V. V., Osipova E. D., Morgun A. V.</i> MODERN MATERIALS FOR MODELING BRAIN TISSUE AND BLOOD-BRAIN BARRIER <i>IN VITRO</i>	117
<i>Krasitskaya V. V., Vorobyeva M. A., Davydova A. S., Bashmakova E. E., Venyaminova A. G., Frank L. A.</i> DEVELOPMENT OF THE BIOLUMINESCENT APTASENSORS FOR DETECTION OF BLOOD BIOMARKERS.....	119

<i>Ронжин Н. О., Могильная О. А., Посохина Е. Д., Бондарь В. С.</i> О ПЕРСПЕКТИВАХ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ОКСИДАЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ И НАНОАЛМАЗОВ В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМ ИНДИКАЦИИ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОЙ АНАЛИТИКИ.....	122
<i>Сорокина Е. В., Образцова Е. А.</i> ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ...	126
<i>Eremeeva E. V., Malikova N. P., Vysotski E. S.</i> SEMI-SYNTHETIC OBELINS AND AEQUORINS WITH VARIOUS COELENTERAZINE ANALOGUES.....	128
<i>Буракова Л. П.</i> ФОТОСТАБИЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ФОТОПРОТЕИНА БЕРОВИНА С СИНТЕТИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ ЦЕЛЕНТЕРАЗИНА.....	130
<i>Krasitskaya V. V., Yaroslavtsev R. N., Kudryavtsev A. N.</i> <i>Vereshchagina T. A., Stolyar S. V., Frank L. A.</i> FUNCTIONALIZED MAGNETIC NANO- AND MICROPARTICLES FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS.....	133
<i>Тюхтева Н. М., Винник Ю. С., Соловьева Н. С., Зуев А. П., Полежаев Л. А.</i> РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ У БОЛЬНЫХ С ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИМИ ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ.....	135
<i>Шаврина Е. О., Савченко А. А.</i> МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА.....	138
<i>Мензянова Н. Г., Пятин С. А., Шишацкая Е. И.</i> ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ФЕНОТИПИЧЕСКУЮ ПОЛЯРИЗАЦИЮ И ЛИПИДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ МАКРОФАГОВ.....	142
<i>Хайдаров Р. Р., Гапурова О. У., Гарипов И. Т., Галиулин И. Г., Евграфова С. Ю.</i> АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ КАТИОНИТА КУ-2-8, МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА.....	144
<i>Копнина Д. О., Жевак Д. И., Шлафер А. А.</i> АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННОГО БОРГИДРИДНЫМ МЕТОДОМ.....	146
<i>Аболенцева П. А.</i> ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ И БОРГИДРИДНЫМ МЕТОДОМ....	150
<i>Василенко Е. В.</i> ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В КОМБИНАЦИИ С ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНОМ.....	153

<i>Thomas S., Raji V, Maria H. J., Kiselev E. G., Nemtsev I. V., Sukhanova I. A. A.</i> BIODEGRADABLE MICROCARRIERS FOR HERBICIDE DELIVERY.....	156
<i>Пятина С. А., Мензянова Н. Г., Шишацкая Е. И.</i> ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДОВ НА ПРОДУКЦИЮ ПОГРАНИЧНЫХ КЛЕТОК И АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В КОРНЕВОМ АПЕКСЕ ПРОРОСТКОВ <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	160
<i>Панамарев Н. С., Башмакова Е. Е., Кудрявцев А. Н., Франк Л. А.</i> ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА RS9904341(G/C) ПРОМОТОРА СУРВИВИНА У ПАЦИЕНТОВ С РМП БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ.....	163
<i>Рыльцева Г. А., Владимиров А. В.</i> СИСТЕМА ЧАСТИЦА-КЛЕТКА НА ОСНОВЕ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ.....	166
<i>Мензянова Н. Г., Пятина С. А.</i> ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЕРБИЦИДНЫХ И ФУНГИЦИДНЫХ ПЕСТИЦИДОВ НА СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ИЗ <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	170
<i>Прудникова С. В., Чураков А. А., Овсянкина С. В., Хижняк С. В.</i> ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АВТОХТОННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ КАРТОФЕЛЯ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В РЕГИОНАХ СИБИРИ...	174
<i>Канцерева Е. М.</i> ВОЗБУДИТЕЛИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ КАРТОФЕЛЯ, РАСПРОСТРАНЕННЫЕ В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ.....	178
<i>Демьянчук Д. А., Канцерева Е. М.</i> ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ДЕПОНИРОВАННЫХ ФОРМ ФУНГИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ <i>IN VITRO</i>	181
<i>Петровская О. Д.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВОБОДНОЙ И ДЕПОНИРОВАННОЙ ФОРМ МЕТРИБУЗИНА.....	184
<i>Петровская О. Д.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ФОРМ ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ ПОСЕВАХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР, ЗАРАЖЕННЫХ СОРНЯКАМИ.....	187
<i>Киселев Е. Г., Барановский С. В., Демиденко А. В., Кураченко Н. Л., Бопп В. Л.</i> ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕПОНИРОВАННОГО ГЕРБИЦИДА ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛА В ПОСЕВАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ.....	190
<i>Бондаренко К. Д.</i> БИОДЕГРАДАЦИЯ СОРБЕНТОВ «УНИСОРЬ» И «УНИСОРЬ-БИО» ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРОЙ.....	195

<i>Шишацкий О. Н.</i> РЫНОК СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В РФ.....	198
<i>Шарапатова А., Шишацкий О., Бопп В.</i> ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕСТИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.....	202
<i>Бабич О. О., Ларина В. В., Скрыпник Л. Н., Пунгин А. В.</i> БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФИТОГЕНИКОВ.....	208
<i>Ефанов М. В., Синецын А. А., Коньшин В. В.</i> ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАПИТКИ ИЗ ДИКОРОСОВ.....	211
<i>Кадрицкая Е. А., Школьников М. Н.</i> К ВОПРОСУ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТОЛИЗОМ ЛУЗГИ ГРЕЧИХИ МЕЛАНИНА В КОНДИТЕРСКИХ ПОЛУФАБРИКАТАХ.....	214
<i>Лапо А. Ю.</i> АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ МХОВ И ЛИШАЙНИКОВ.....	216
<i>Шевелева И. В.</i> БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У <i>PINUS PUMILA</i>	219
<i>Кособуко Д. В.</i> ФИТОПЛАНКТОН – ПОКАЗАТЕЛЬ КАЧЕСТВА ВОДЫ АБАКАНСКОЙ ПРОТОКИ РЕКИ ЕНИСЕЙ.....	222