

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Сибирский федеральный университет»

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

**III-я Международная научная конференция**

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

**III International scientific conference**

**Conference proceedings**

**Красноярск  
30 сентября – 4 октября  
2018**

УДК 620.22  
ББК 30.600  
Б 63

Б 63     III-я Международная научная конференция «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни». Материалы конференции / Красноярск, 2018. – 160 с.

ISBN 978-5-906740-13-7

Материалы III-й Международной научной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни».

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

УДК 620.22  
ББК 30.600

*Конференция проведена в рамках реализации Программы повышения конкурентоспособности СФУ и мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» – соглашения № 074-02-2018-328 (конкурс для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских вузах и научных организациях по Постановлению правительства РФ от 09 апреля 2010 года № 220; VI очередь) (The conference was financially supported by Project “Agroreparations of the new generation: a strategy of construction and realization” in accordance agreement № 074-02-2018-328 (with Resolution No 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))*

ISBN 978-5-906740-13-7

© Сибирский федеральный университет, 2018

*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*



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

## ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

30 сентября (воскресенье)

Заезд и размещение иногородних участников

1 октября 2018 года (понедельник)

10.00–11.00	Регистрация участников: СФУ, пр. Свободный, 79/10, корпус № 10 (библиотека), ауд. Б 1-01Б
11.00–13.30	Утреннее заседание
11.00–11.20	<b>ОТКРЫТИЕ III-ОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ – ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА – КАЧЕСТВО ЖИЗНИ»</b>  И.о. ректора СФУ, проф. В. И. Колмаков  <b>О РОЛИ БИОТЕХНОЛОГИИ В НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СФУ</b>  Проф. М.И. Гладышев – проректор по науке СФУ
11.20–12.05	<b>MAJOR ANTHROPOGENIC PRESSURES FROM CHEMICALS RELATED TO HUMAN AND ENVIRONMENTAL HEALTH</b>  Prof, Dr Aristides Tsatsakis  <i>Laboratory of Toxicology, School of Medicine, University of Crete, Greece</i>
12.05–12.30	<b>ENGINEERING AT THE NANOSCALE: A STRATEGY FOR DEVELOPING HIGH PERFORMANCE FUNCTIONAL ECO- FRIENDLY GREEN POLYMER NANOCOMPOSITES</b>  Prof, Dr Sabu Thomas  <i>International and Inter University Centre for Nanoscience and Nanotechnology, Mahatma Gandhi University, India</i>

12.30–13.30	Обед
13.30–18.00	Вечернее заседание
Ведущие заседания: Prof, Dr Sabu Thomas, проф. Е.И. Шишацкая	
13.30–14.00	<p><b>STATE OF ART IN NANOCARRIERS AIMING AGRICULTURE AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS</b></p> <p><b>Prof, Dr Leonardo Fernandes Fraceto</b></p> <p><i>Laboratory of Environmental Nanotechnology, Institute of Science and Technology of Sorocaba, São Paulo State University (UNESP), Brazil</i></p>
14.00–14.30	<p><b>TRENDS IN BIOGENIC METAL NANOPARTICLES: FROM THE SYNTHESIS TO AGRICULTURE APPLICATIONS</b></p> <p><b>Prof, Dr Renata de Lima</b></p> <p><i>Labiton – Bioactivity Assessment and Toxicology of Nanomaterials Lab, Sorocaba University (Uniso), São Paulo State, Brazil</i></p>
14.30–15.00	<p><b>DESIGN IN BIOTECHNOLOGY: BIOLUMINESCENT BIOSENSORS</b></p> <p><b>Prof, Dr V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova</b></p> <p><i>Siberian Federal University, Institute of Biophysics SB RAS</i></p>
15.00–15.20	<p><b>БЫСТРАЯ КИНЕТИКА <math>Ca^{2+}</math>-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНОВ: МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭМИТТЕРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ</b></p> <p><b>к.б.н. Е.В Еремеева, С.И. Барцев, Е.С. Высоцкий</b></p> <p><i>Институт биофизики СО РАН, (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>
15.20–15.50	Кофе-пауза
Ведущие заседания: Prof, Dr A. STEINBÜCHEL, проф. М.И. Штильман	
15.50–16.20	<p><b>БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРНОЙ СЕНСОРИКИ</b></p> <p><b>проф., д.б.н. Л.А. Франк, Е.Е. Башмакова, В.В. Красицкая</b></p> <p><i>Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>
16.20–16.40	<p><b>ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИЗОФОРМЫ MLC164 ЛЮЦИФЕРАЗЫ METRIDIA, СИНТЕЗИРОВАННОЙ В E.COLI</b></p> <p><b>Д.А. Горбунова, к.б.н. С.В. Маркова</b></p> <p><i>Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>

16.40-17.00	<p><b>HEAT SHOCK PROTEIN 90 AS POTENTIAL STRESS AND CANCER BIOMARKER</b></p> <p><b>PhD, Dr R. Ranjan</b></p> <p><i>Fermentation Technology and Bioengineering Department, CSIR – Central Food Technological Research Institute, Mysore, India</i></p>
17.00–17.20	<p><b>DIFFERENTIAL ROLE OF DIETARY FIBERS AND CALORIE RESTRICTION ON SIRTUIN PROTEIN</b></p> <p><b>Ph, Ds S. Pande</b></p> <p><i>Fermentation Technology and Bioengineering Department, CSIR – Central Food Technological Research Institute, Mysore, India</i></p>
17.20–17.40	<p><b>ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ФОТОПРОТЕИНА БЕРОВИНА С ПОМОЩЬЮ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА</b></p> <p><b>к.б.н. Л.П. Буракова, Д.С. Демьянчук, Е.С. Высоцкий</b></p> <p><i>Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>
17.40–17.50	<p><b>ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОДЕЛЬНЫХ СРЕД НА СТРУКТУРУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ</b></p> <p><b>Л.А. Суковатый, А.А. Деева, Е.В. Немцева</b></p> <p><i>Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>
17.50–18.00	Информация оргкомитета конференции

**02 октября 2018 года (вторник)**

10.00–13.20	Утреннее заседание
-------------	--------------------

**Ведущие заседания: Prof, Dr Leonardo Fernandes Fraceto, к.б.н. А.Н. Бояндин**

10.00–10.30	<p><b>PRODUCTION OF NON-BIODEGRADABLE BIOPOLYMERS: CURRENT STATE AND PERSPECTIVES</b></p> <p><b>Prof, Dr Alexander Steinbüchel, Christina Andreessen</b></p> <p><i>Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany</i></p>
10.30–11.00	<p><b>NEW NANOSCALE POLYMER SYSTEMS AND THEIR INTERACTION WITH LIVING OBJECT</b></p> <p><b>Prof M.I. Shtilman, A.N. Kuskov<sup>1</sup>, P.P. Kulikov<sup>1</sup>, A.L.Luss<sup>1</sup>, A.V. Goryachaya<sup>1</sup>, V.T. Jedzheya<sup>1</sup>, A.M. Tsatsakis<sup>2</sup></b></p> <p><i><sup>1</sup>D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russian, Department of Biomaterials, <sup>2</sup>University of Crete, Medical School, Division Morphology, Greece</i></p>

11.00–11.20	<p><b>БАКТЕРИИ <i>S. EUTROPHUS</i> B-10646 – ПРОДУЦЕНТЫ РАЗНООБРАЗНЫХ ПГА НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ</b></p> <p>к.б.н. Н.О. Жила</p> <p><i>Институт биофизики СО РАН, (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>
11.20–11.40	<p><b>РЕАЛИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ПГА НА ГЛИЦЕРИНЕ В УСЛОВИЯХ ОПЫТНОГО ПРОИЗВОДСВА</b></p> <p>к.б.н. Е.Г. Киселев, А.В. Демиденко</p> <p><i>Институт биофизики СО РАН, (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i></p>
11.40–12.20	<p><b>Кофе-пауза</b></p>
<p><b>Ведущие заседания: Prof, Dr Aristides Tsatsakis, проф. Л.А. Франк</b></p>	
12.20–12.40	<p><b>ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО РЕЛЬЕФА БИОПОЛИМЕРОВ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ МОНОЦИТОВ-МАКРОФАГОВ <i>IN VITRO</i></b></p> <p>проф., д.б.н. Е.И. Шишацкая, Н.Г. Мензянова, С.В. Пятина, Д.П. Столяров, Д.Б. Дрыганов, Е.П. Сахнов</p> <p><i>Сибирский федеральный университет, Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии</i></p>
12.40–13.00	<p><b>POLYMERIC MICRO- AND NANOPARTICLES AS A PLATFORM FOR ENCAPSULATION AND DELIVERY DRUGS BASED ON BIORESORBABLE POLYHYDROXYALKANOATES</b></p> <p>PhD A.V. Murueva, A.M. Shershneva, E.I. Shishatskaya</p> <p><i>Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Russia</i></p>
13.00–13.20	<p><b>ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ РАН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГИБРИДНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ</b></p> <p>к.б.н. Е. Николаева, А. Шумилова, И. Шидловский</p> <p><i>Институт биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН), Сибирский федеральный университет Красноярск, Россия</i></p>
13.20–14.20	<p><b>Обед</b></p>
14.20–18.00	<p><b>Вечернее заседание</b></p>
<p><b>Ведущие заседания: Prof, Dr Renata de Lima, проф. В.А. Кратасюк</b></p>	
14.20-14.50	<p><b>CELL CYCLE-SPECIFIC ACCUMULATION OF 5-HYDROXYMETHYLURACIL ON ALPHA SATELLITES INDICATES ITS POTENTIAL ROLE IN ESTABLISHMENT OF CENTROMERIC CHROMATIN IN HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS</b></p>

	<b>Prof A. Ruzov</b> , Abakir, T. Giles, D. Gackowski, J. Crutchley, D. Alves Moreira da Silva, E. Prokhortchouk, C. Denning, R. Emes, R. Olinski <i>School of Medicine, University of Nottingham, Nottingham, UK</i>
<b>14.50–15.10</b>	<b>КОСТНОПЛАСТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ПГА</b> <b>к.б.н. А. Шумилова</b> <i>Сибирский федеральный университет, Россия</i>
<b>15.10–15.20</b>	<b>РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ 3D-ФОРМОВАНИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ</b> <b>К.А. Кистерский</b> , А.В. Демиденко, С.И. Жестовская, Н.В.Тюменцев, Е.И. Шишацкая <i>Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Сибирский федеральный университет, Россия</i>
<b>15.20–15.40</b>	<b>Кофе-пауза</b>
<b>15.40–18.00</b>	<b>ПОСТЕРНАЯ СЕССИЯ</b>
<b>03 октября 2018 года (среда)</b>	
<b>10.00–14.00</b>	<b>Утреннее заседание</b>
<b>Ведущие заседания: PhD R. Ranjan, к.б.н. Н.А. Жила</b>	
<b>10.00–10.30</b>	<b>CLOSURE OF THE EARTH'S BIOSPHERE: EVOLUTION, CURRENT STATE AND PERSPECTIVES</b> <b>Prof, Dr S.I. Bartsev</b> , A.G. Degermendzhi, A.B. Sarangova <i>Institute of Biophysics SB RAS, “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Russia</i>
<b>10.30–11.00</b>	<b>METHANOTROPHIC ABILITY OF MOSSES AND LICHENS ASSOCIATED BACTERIA IN THE BAIKAL LAKE REGION</b> V. Kadutskiy, <b>prof. S. Evgrafova</b> , L. Krivobokov, S. Prudnikova <i>Siberian Federal University, V.N. Sukachev Institute of Forest FIC KRC SB RAS, Russia</i>
<b>11.00–11.30</b>	<b>BIODEGRADABLE COMPOSITE SYSTEMS AS LONG TERM CARRIERS OF AGRICULTURAL PREPARATIONS</b> <b>PhD A.N. Boyandin</b> <i>Siberian Federal University, Institute of Biophysics SB RAS, “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Russia</i>

<b>11.30–12.00</b>	<b>BIOINDICATION FOR ESTIMATING BIOLOGICAL INTEGRITY OF LAKES</b> <b>Prof A.M. Belyaeva</b> , J.R. Fischer, M.C. Quist, J.A. Downing <i>Iowa State University North Carolina State University, University of Idaho, University of Minnesota, USA</i>
<b>12.00–12.20</b>	<b>Кофе-пауза</b>
<b>Ведущие заседания: проф. С.И. Барцев, prof. S. Evgrafova</b>	
<b>12.20–12.50</b>	<b>МИКРООРГАНИЗМЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В КРИОГЕННЫХ ПОЧВАХ СУБАРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ</b> <b>проф., д.б.н. С. В. Прудникова</b> , С.Ю. Евграфова <i>Сибирский федеральный университет, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Россия</i>
<b>12.50–13.10</b>	<b>ANTIFUNGAL ACTIVITY OF P3NB MICROPARTICLES CONTAINING TEBUCONAZOLE</b> <b>PhD A.M. Shershneva</b> , PhD A.V. Murueva <i>Institute of Biophysics SB RAS, “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Russia; Siberian Federal University, Russia</i>
<b>13.10–13.30</b>	<b>ПОДВЕДЕНИЕ ИТОГОВ ПОСТЕРНОЙ СЕССИИ</b> <b>НАГРАЖДЕНИЕ ПОБЕДИТЕЛЕЙ</b>
<b>13.30–14.00</b>	<b>ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ДИСКУССИЯ</b>
<b>14.00–15.00</b>	<b>Обед</b>
<b>15.00-16.00</b>	<b>Экскурсия по кампусу СФУ</b>
<b>16.00-18.00</b>	<b>Экскурсия по г. Красноярск</b>

**04 октября 2018 года (среда)**

**Отъезд участников конференции**



**LIPID PROTECTION OF GOLD NANOPARTICLES AGAINST AGGLOMERATION**

**M.A. Kirillova<sup>1</sup>**, R. Ranjan<sup>3</sup>, E.N. Esimbekova<sup>2,1</sup>, V.A. Kratasyuk<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratory of Bioluminescent Biotechnologies, Department of Biophysics, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University*

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"*

<sup>3</sup>*Fermentation Technology and Bioengineering Department, CSIR – Central Food Technological Research Institute*

**ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА IL28B КАК МАРКЕРЫ УСПЕШНОСТИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНОМ**

**Д.В. Лагутинская<sup>1</sup>**, М.А. Столяр<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ WT1 И HMGA2 ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

**Н.С. Белевцова**

*Сибирский федеральный университет*

*Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» МЗ РФ*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗРАСТНОГО СОСТАВА ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ И КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНА ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ПАТОЛОГИИ ДИФфуЗНЫЙ ТОКСИЧЕСКИЙ ЗОБ**

**В.А. Беглякова**, Ф.А. Гершкорон

*Сибирский федеральный университет*

**ОТБОР ДНК-АПТАМЕРОВ К ТРОПОНИНУ I**

**Н.С. Гончарова<sup>1</sup>**, Е.Е. Башмакова<sup>2</sup>, В.В. Красицкая<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

**ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА RS 7785846 (C/T) В ГЕНЕ PON2 В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

**А.Д. Юшкова<sup>1</sup>**, Л.А. Франк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **СХЕМА КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА БЕЗОПАСНОСТИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СРЕД**

**В.П. Калябина<sup>1,2</sup>, Е.Н. Есимбекова<sup>1,2</sup>, В.А. Кратасюк<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ОБЩЕЙ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНА**

**Т.Н. Евсеева<sup>1</sup>, А.М. Выshedко<sup>1</sup>, Л.И. Александрова<sup>1</sup>, Б.Б. Гомбоев<sup>1</sup>, Л.В. Степанова<sup>1</sup>, О.А. Коленчукова<sup>2</sup>, В. А. Кратасюк<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера*

<sup>3</sup>*ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КАК МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ В СПОРТИВНОМ КОНЕВОДСТВЕ**

**О.В. Колесник<sup>1</sup>, Л.В. Степанова<sup>1,2</sup>, А.С. Федотова<sup>3</sup>, О.А. Коленчукова<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

<sup>3</sup>*Красноярский государственный аграрный университет*

<sup>4</sup>*Научно-исследовательский институт медицинских проблем севера*

## **ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА БЕЗОПАСНОСТИ ПЛОДООВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ**

**К.В. Копылова<sup>1</sup>, В.П. Калябина<sup>1,2</sup>, Е.Н. Есимбекова<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ**

**В.И. Лоншакова-Мукина<sup>1</sup>, Е.Н. Есимбекова<sup>2,1</sup>, В.А. Кратасюк<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ *UREIBACILLUS THERMOSPHERAERICUS*, ПОЛУЧЕННОЙ ПУТЕМ КО-ЭКСПРЕССИИ С ШАПЕРОНАМИ**

**Ю.В. Самойлова<sup>1</sup>, К.Н. Сорокина<sup>1,2</sup>, А.В. Пилигаев<sup>1</sup>, В.Н. Пармон<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН*

<sup>2</sup>*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет*

## **ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛИ *MICRASTINIUM SP. IC-76* И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДХОДА К ЕЁ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОПЕРЕЧНО-СШИТЫХ АГРЕГАТОВ ФЕРМЕНТА ЛИПАЗЫ БАКТЕРИИ *BURKHOLDERIA CEPACIA***

**А.В. Пилигаев<sup>1</sup>**, Ю.В. Самойлова<sup>1</sup>, К.Н. Сорокина<sup>1,2</sup>, В.Н. Пармон<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

**ВЛИЯНИЕ ФРУКТОЗЫ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОГО С-СУБСТРАТА НА РОСТ И СИНТЕЗ ЗАПАСНЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ШТАММОМ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646**

**К.Ю. Сапожникова**

*Сибирский федеральный университет*

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРЫ 4-ГИДРОКСИБУТИРАТА**

**В.С. Безбидо**

*Сибирский федеральный университет*

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРЫ 4-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА**

**М. Д. Косенок<sup>1</sup>**, Н. О. Жила<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

**ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТОВ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СИНТЕЗА МОНОМЕРОВ 3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА НА РОСТ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646 И СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРА П(ЗГБ-со-ЗГВ)**

**В.В. Фохт**

*Сибирский федеральный университет*

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА, ЛИПИДНОГО ОБМЕНА И АККУМУЛЯЦИИ РЕЗЕРВНЫХ БИОМОЛЕКУЛ В КУЛЬТУРЕ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646, КУЛЬТИВИРУЕМОЙ НА ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЕ**

**О.А. Богданова**

*Сибирский федеральный университет*

**ВЛИЯНИЕ NaCl НА РОСТ БАКТЕРИЙ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646 И СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРА ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ/3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ)**

**К.С. Болотова**

*Сибирский федеральный университет*

**СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРЫ 3-МЕРКАПТОПРОПИОНАТА БАКТЕРИЯМИ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646**

**С.С. Захарова**

*Сибирский федеральный университет*

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ БАКТЕРИЙ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646 И СИНТЕЗ ПОЛИМЕРА**

**В. А. Хнытикова**

*Сибирский федеральный университет*

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИВЕННО ВВЕДЕННЫХ НАНОАЛМАЗОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ**

Е.В. Инжеваткин<sup>1,2</sup>, А.В. Барон<sup>1,3</sup>, Н.Г. Максимов<sup>1,4</sup>, **М.Б. Волкова<sup>1,3</sup>**, А.П. Пузырь<sup>1,2</sup>, Н.О. Ронжин<sup>1</sup>, В.С. Бондарь<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*ИБФ СО РАН ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

<sup>2</sup>*МНЦИЭСО ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

<sup>3</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>4</sup>*ИХХТ СО РАН ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **ХАРАКТЕРИСТИКИ СМЕСЕЙ РАЗРУШАЕМОГО ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА С ПРИРОДНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ**

С. В. Барановский, А. Н. Бояндин, Е. Г. Киселев, **А. П. Кузьмин**, А. А. Шумилова  
*Сибирский федеральный университет*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРИМОСТИ ПОЛИЭФИРОВ В НЕГАЛОИДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ**

**А.С. Хит<sup>1</sup>**, А.Н. Бояндин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОСФЕРИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (БАВ) ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ**

**А.В. Владимирова<sup>1</sup>**, А.М. Шершнева<sup>2</sup>, А.В. Муруева<sup>2</sup>, Е.И. Шишацкая<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ РАН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ**

Е. Н. Николаева<sup>1</sup>, А. А. Шумилова<sup>2</sup>, **И. Шидловский<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН»*

## **ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛАСТИЧНЫХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ТРИАЦЕТИНА**

**Н. Л. Ертилецкая**, А. А. Шумилова

*Сибирский федеральный университет*

## **ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПГА И ПОРООБРАЗОВАТЕЛЕЙ**

**Д.С. Малышева**

*Сибирский федеральный университет*

**ПОЛУЧЕНИЕ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ  
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ МЕТОДАМИ ХОЛОДНОГО ПРЕССОВАНИЯ С  
ПОСЛЕДУЮЩИМ ПЛАВЛЕНИЕМ**

**К.А. Зубакина**

*Сибирский федеральный университет*

**ПОЛУЧЕНИЕ ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПГА МЕТОДОМ  
ФАЗОВОГО РАЗДЕЛЕНИЯ**

**А.А. Калинин**

*Сибирский федеральный университет*

**КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ  
ХИТОЗАНА И ПГА**

**А.Е. Мурзова**

*Сибирский федеральный университет*

**РАЗРАБОТКА ПЕРФУЗИОННОЙ КУЛЬТИВАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ  
ПОЛУЧЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДОВ**

**Д. Д. Николаев**

*Сибирский федеральный университет*

**ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПЛОМБИРОВОЧНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ  
ПГА**

**А.А. Федченко, А.А. Шумилова**

*Сибирский федеральный университет*

**РАННЯЯ ОЦЕНКА БИМЕДИЦИНСКИХ РАЗРАБОТОК**

**О.Н. Шишацкий**

*Отдел прогнозирования экономического развития Красноярского края ИЭОПП СО  
РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН*

**ЗООБЕНТОС КАК ИНДИКАТОР ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ  
ВОДОХРАНИЛИЩА НА Р. БУГАЧ, РАСПОЛОЖЕННОГО В РАЙОНЕ Г.  
КРАСНОЯРСКА**

**В.А. Лавринович**

*Сибирский федеральный университет*

**СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛЕТНЕГО ФИТОПЛАНКТОНА  
ВОДОХРАНИЛИЩА БУГАЧ**

**О. А. Абрамова, Е. А. Иванова**

*Сибирский федеральный университет*

**АЛКЕНОНЫ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СОЛЕННЫХ ОЗЕР КАК БИОИНДИКАТОР  
ПАЛЕОТЕМПЕРАТУРЫ В ПОЗДНЕМ ГОЛОЦЕНЕ**

**А.О. Бульхин**

*Сибирский федеральный университет*

**ДОННЫЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ В ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ ПРИУСТЬЕВЫХ РАЙОНОВ РЕК БЕРЁЗОВКА И ЕСАУЛОВКА (КРАСНОЯРСКИЙ КРАЙ)**

**Н. И. Кислицина**

*Сибирский федеральный университет*

**ВЛИЯНИЕ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ КУЛЬТУР *PINUS SP.* НА ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБОЦЕНОЗ В АРИДНЫХ УСЛОВИЯХ**

**А. А. Чигринская<sup>1</sup>, В.А. Сенашова<sup>2</sup>, Е.Н. Афанасова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН*

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ СНЕЖНОГО ПОКРОВА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

**С. Ю. Семёнова<sup>1</sup>, С.Ю. Евграфова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>2</sup>*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН*

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВ И ВОДОЕМОВ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

**Шевчук Д.А., Туркин К.А.**

*Сибирский федеральный университет*

**САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ САПРОПЕЛЕВЫХ ГРЯЗЕЙ ОЗЕРА ПЛАХИНО (БОРОВОЕ)**

**А.А. Серeda**

*Сибирский федеральный университет*

**РАЗРУШАЕМОСТЬ СМЕСОВЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА В ПОЧВЕ**

**В. Афанасьев, А. Гвоздев**

*Сибирский федеральный университет*

**ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДРЕВЕСИНЫ *PINUS SIBIRICA*, ПОРАЖЁННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВОДЯНКОЙ, НА РОСТ И РАЗВИТИЕ СЕМЯН *PINUS SYLVESTRIS***

**И.Д. Гродницкая<sup>1</sup>, Н.А. Муштукова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН*

<sup>2</sup>*Сибирский федеральный университет*

**АНАЛИЗ СХОДСТВА ПОПУЛЯЦИЙ *CORYDALIS BRACTEATA SENSU LATO*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЮЖНОЙ ЧАСТИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ**

**К.К. Рябова**

*Сибирский федеральный университет*

**ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЯГОД ЖИМОЛОСТИ ГОЛУБОЙ**

**Н.Ю. Теплюк**

*Сибирский федеральный университет*



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

# ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ





## **РАЗДЕЛ 1.**

# **ПОТЕНЦИАЛ БИОТЕХНОЛОГИИ: НАНОСИСТЕМЫ, БИОТЕСТЫ И ДИАГНОСТИКУМЫ**



## **MAJOR ANTHROPOGENIC PRESSURES FROM CHEMICALS RELATED TO HUMAN AND ENVIRONMENTAL HEALTH**

**Aristides Tsatsakis**

*Academician RAS (Hygiene-Toxicology), Department of Toxicology & Forensic Science,  
Medical School, University of Crete, Voutes Campus, Heraklion 71003*

*E-mail: aristidistsatsakis@gmail.com*

Toxicology as science is found in a turning point, that need to be strengthened as an academic discipline and to remind the governments and the public of the necessity of toxicology in protecting the health of consumers, workers, the general population and the environment. The Toxicology of the 21st century faces with the challenge of explain why from epidemiological studies we found that chemicals in doses consider safety are important factors that lead to the development of different chronic diseases. In some cases this can be explained by the fact that humans are exposed simultaneously or sequentially to large numbers of chemicals from various sources. Chemical mixtures represent the biggest concern of the specialists in the field, and especially the low-level, long-term exposure to which the population is routinely encountered. New methodologies that intend to study long-term toxicity of non-commercial chemical mixtures with the aim of investigating simultaneously target organ toxicity, genotoxicity and endocrine disruption endpoints, and systemic mechanistic pathways as oxidative stress have been proposed and need be validate in order to be included in regulatory work for better assessment of chemicals risk.

## **ENGINEERING AT THE NANOSCALE: A STRATEGY FOR DEVELOPING HIGH PERFORMANCE FUNCTIONAL ECO-FRIENDLY GREEN POLYMER NANOCOMPOSITES**

**Sabu Thomas**

*International and Inter University Centre for Nanoscience and Nanotechnology, School of  
Chemical Sciences, Mahatma Gandhi University, Priyadarshini Hills P. O.*

*Kottayam, Kerala, India – 686 560*

*E-mail: sabuchathukulam@yahoo.co.uk*

The talk will concentrate on various approaches being used to engineer materials at the nanoscale for various applications in future technologies. In particular, the case of clay, carbon nanostructures (e.g. nanotubes, graphene), metal oxides, bionanomaterials (cellulose, starch and chitin) will be used to highlight the challenges and progress. Several bio-degradable polymer systems will be considered such as rubbers, thermoplastics, thermoetts and their blends for the fabrication of functional polymer nanocomposites. The interfacial activity of nanomaterials in compatibilising binary polymer blends will also be discussed. Various self assembled architectures of hybrid nanostructures can be made using relatively simple processes. Some of these structures offer excellent opportunity to probe novel nanoscale behavior and can impart unusual macroscopic end properties. I will talk about various applications of these materials, taking into account their multifunctional properties. Some of the promising applications of clay, metal oxides, nano cellulose, chitin, carbon nanomaterials and their hybrids will be reviewed.

## **PRODUCTION OF NANOMATERIALS AS GREEN FILLERS FROM BIOWASTES**

**Sabu Thomas**

*International and Inter University Centre for Nanoscience and Nanotechnology,  
School of Chemical Sciences, Mahatma Gandhi University, Priyadarshini Hills P. O.  
Kottayam, Kerala, India – 686 560*

*E-mail: sabuchathukulam@yahoo.co.uk*

Green chemistry started for the search of benign methods for the development of nanoparticles from nature and their use in the field of antibacterial, antioxidant, and antitumor applications. Bio wastes are eco-friendly starting materials to produce typical nanoparticles with well-defined chemical composition, size, and morphology. Cellulose, starch, chitin and chitosan are the most abundant biopolymers around the world. All are under the polysaccharides family in which cellulose is one of the important structural components of the primary cell wall of green plants. Cellulose nanoparticles (*fibers, crystals and whiskers*) can be extracted from agrowaste resources such as jute, coir, bamboo, pineapple leaves, coir etc. Chitin is the second most abundant biopolymer after cellulose, it is a characteristic component of the cell walls of fungi, the exoskeletons of arthropods and nanoparticles of chitin (*fibers, whiskers*) can be extracted from shrimp and crab shells. Chitosan is the derivative of chitin, prepared by the removal of acetyl group from chitin (*Deacetylation*). Starch nano particles can be extracted from tapioca and potato wastes. These nanoparticles can be converted into smart and functional biomaterials by functionalisation through chemical modifications (*esterification, etherification, TEMPO oxidation, carboxylation and hydroxylation etc*) due to presence of large amount of hydroxyl group on the surface. The preparation of these nanoparticles include both series of chemical as well as mechanical treatments; crushing, grinding, alkali, bleaching and acid treatments. Transmission electron microscopy (*TEM*), scanning electron microscopy (*SEM*) and atomic force microscopy (*AFM*) are used to investigate the morphology of nanoscale biopolymers. Fourier transform infra-red spectroscopy (*FTIR*) and x ray diffraction (*XRD*) are being used to study the functional group changes, crystallographic texture of nanoscale biopolymers respectively. Since large quantities of bio wastes are produced annually, further utilization of cellulose, starch and chitins as functionalized materials is very much desired. The cellulose, starch and chitin nano particles are currently obtained as aqueous suspensions which are used as reinforcing additives for high performance environment-friendly biodegradable polymer materials. These nanocomposites are being used as biomedical composites for drug/gene delivery, nano scaffolds in tissue engineering and cosmetic orthodontics. The reinforcing effect of these nanoparticles results from the formation of a percolating network based on hydrogen bonding forces. The incorporation of these nano particles in several bio-based polymers have been discussed. The role of nano particle dispersion, distribution, interfacial adhesion and orientation on the properties of the ecofriendly bio nanocomposites have been carefully evaluated.

## STATE OF ART IN NANOCARRIERS AIMING AGRICULTURE AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS

**Leonardo Fernandes Fraceto**

*Laboratory of Environmental Nanotechnology, Institute of Science and Technology of Sorocaba, São Paulo State University (UNESP), Av. Três de março, 511, Sorocaba, São Paulo State, Brazil, 18087-180*

*E-mail: leonardo.fraceto@unesp.br*

Food production for a rapidly growing human population is one of the major challenges for the agriculture sector. Therefore, the increasing in the uses of pesticides and fertilizers have become essential to maximize the agricultural productivity. In this context, the rapid growth of nanotechnology has led to the development of a wide range of nanomaterials intended to improve the effectiveness and safety of agricultural solutions in crop protection. Also, various nanocarriers have been developed to agricultural uses and environmental applications. These nanocarriers include nanodispersions, nanoemulsions and inorganic nanoparticles and they aims to: i) increase the solubility of the active compounds; (ii) release them slowly and/or (iii) protect them against premature degradation as well as they can increase the biological activity by the target release in organisms [1, 2].

In this lecture will be presented the main results in the development of nanocarrier systems containing active ingredients aiming agricultural and environmental applications. In our research group we have been developed carrier systems based on several natural and synthetic matrices for the encapsulation of synthetic compounds as well as botanical compounds and organisms (such as fungus) [3-5]. In addition, the developed nanopesticides were able to decrease the amount of active ingredient used to obtain the same biological activity thus increasing the efficiency, decreasing toxicity and the environmental impacts. Therefore, nanotechnology can impact the agriculture sector, especially by the minimizing adverse problems of the use of pesticides and as the consequence decreasing the environment impacts and increasing the food security [6].

*Acknowledgments: São Paulo Science Foundation, CNPq and CAPES.*

### References

1. Oliveira, J.L de *et al.*. *Biotechnol. Adv.* 32, 1550–1561 (2014).
2. Grillo, R., Rosa, A. H. & Fraceto, L. F. *Chemosphere* 119, 608–619 (2015).
3. Oliveira, J. L. de *et al.*. *J. Agric. Food Chem.* 66, 1330–1340 (2018).
4. Campos, E. V. R. *et al. Sci. Rep.* 8, 7623 (2018).
5. Grillo, R. *et al. J. Hazard. Mater.* 278, 163–171 (2014).
6. Fraceto, L. F. *et al. Front. Environ. Sci.* 4, (2016).

## TRENDS IN BIOGENIC METAL NANOPARTICLES: FROM THE SYNTHESIS TO AGRICULTURE APPLICATIONS

**Renata de Lima**

*Labiton – Bioactivity Assessment and Toxicology of Nanomaterials Lab, Sorocaba University  
(Uniso)*

*Rodovia Raposo Tavares km 92,5, Sorocaba, São Paulo State, Brazil, 18023-000*

*E-mail: renata.lima@prof.uniso.br*

Nanotechnology in the field of agriculture is already a reality, studies show that this can aid in both fertilization and containment of agricultural pests, resulting in a better performance of crops, but new studies are needed to ensure their effectiveness and safety. Among the many possibilities, the green synthesis of metallic nanoparticles emerges as a promise for a sustainable agriculture, the biological synthesis has gained space in science because it is a technique that is based on principles of green chemistry, which aims at the development of technologies in a sustainable way and can be defined as clean and ecologically correct nanotechnology. In general, the synthesis of biogenic nanoparticles results on synergy between the metal and the reducing agent used, which allows, in addition to attribute a coating to the nanoparticle due accumulate of secondary metabolites present in the extract or culture. These coating presents positive characteristics and in this way the properties of the metal nanoparticles can be potentiated (Guilger et al., 2017). This factor shows that the targeted synthesis of biogenic metallic nanoparticles may be an interesting strategy, since the coating generated may lead to this nanoparticle having unique characteristics. The application of nanotechnology in agriculture demands continuous and innovative studies due to its diversity of application, being a promise of possible solution to increase food production, so it can be considered the new era technology.

### References

Guilger, M.; Pasquoto-Stigliani T.; Bilesky-Jose N.; Grillo R.; Abhilash P. C.; Fraceto L. F.; Lima R. Biogenic silver nanoparticles based on *trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Sci. Rep.* 7, 44421; doi: 10.1038/srep44421 (2017).

## LIPID PROTECTION OF GOLD NANOPARTICLES AGAINST AGGLOMERATION

**M.A. Kirillova<sup>1</sup>, R. Ranjan<sup>3</sup>, E.N. Esimbekova<sup>2,1</sup>, V.A. Kratasyuk<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratory of Bioluminescent Biotechnologies, Department of Biophysics, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, 79 Svobodny prospect, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

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

<sup>3</sup>*Fermentation Technology and Bioengineering Department, CSIR – Central Food Technological Research Institute, Mysore, India*

*E-mail: kirillva@mail.ru*

**Keywords:** Gold nanoparticles; Ionic interference; Agglomeration; Stabilization; Lipid capping

Gold nanoparticles (AuNPs) possess unique physical and chemical characteristics that make them excellent tools for fabrication of biosensors. The properties of AuNPs are size dependent and can vary in the presence of external ligands, magnetic fields and electrolyte ions [1]. High ionic strength of the solution causes agglomeration of AuNPs and delimit their application in biosensing of analytes in ionic solutions. In the present investigation, we used lipid mixture 1 to shield AuNPs against aggregation in aqueous sodium chloride solution with increasing ionic strengths (100 to 400 mM).

AuNPs were synthesized using sodium citrate led reduction method [2]. Four different types of AuNPs were prepared where AuNP1 and AuNP2 contained 1.55 mM and 3.1 mM of trisodium citrate respectively and 0.29 mM chloroauric acid while AuNP3 and AuNP4 had 5.3  $\mu$ M and 10.6  $\mu$ M of silver nitrate respectively with 1.55 mM trisodium citrate and 0.29 mM chloroauric acid. TEM analysis revealed AuNPs to be predominantly faceted nanocrystals with the average size of AuNP1 to be  $35 \pm 5$  nm, AuNP2  $15 \pm 5$  nm, AuNP3  $30 \pm 5$  nm, and AuNP4  $30 \pm 5$  nm and the zeta-average for AuNPs were calculated to be 31.23, 63.80, 26.08, and 28 nm respectively.

Aggregation of AuNPs in the presence of sodium chloride was observed within 10 sec. In the presence of NaCl solutions, ionic interference drastically hamper the citrate capping of AuNPs causing to AuNPs aggregation and lose their plasmonic properties. During this phase, their characteristic plasmonic peak broadens and shows decreased absorption. Broadening of peak and shift of plasmonic peak towards red region was observed leading to purple-blue appearance of AuNPs. Peak broadening indicates non-uniform aggregation of AuNPs leading to formation of particles of varied size [3].

In contrast, lipid-treated AuNPs (AuNP-L) was found to withstand ionic interferences at all NaCl concentration levels. However, AuNP1-L and AuNP2-L were more stable than AuNP3-L and AuNP4-L in sodium chloride solution. This observation was further supported with the zeta potential and size measurements for the AuNPs before and after treatment with lipid mixture 1. It was shown that  $Ag^+$  ions played a significant negative role in lipid-based stabilization of AuNPs.  $Ag^+$  ions forming a layer on the AuNP3 and AuNP4 surface and this layer is involved in destabilization of these AuNPs against ionic interferences. Despite this the AuNPs-L has a very high shelf life and resists agglomeration even at 400 mM sodium chloride strength.

*The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research [Project No 16-34-60100]*

#### **References**

1. Saha K., Agasti S.S., Kim C., Li X., Rotello V.M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing // *Chemical Review*, 2012, 112(5), P. 2739–2779
2. Abhijith K.S., Sharma R., Ranjan R., Thakur M.S. Facile synthesis of gold–silver alloy nanoparticles for application in metal enhanced bioluminescence // *Photochemical & Photobiological Sciences* 2014, 13(7), P. 986–991
3. Han X., Goebel J., Lu Z., Yin Y. Role of salt in the spontaneous assembly of charged gold nanoparticles in ethanol // *Langmuir*, 2011, 27(9), P. 5282–5289

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРНОЙ СЕНСОРИКИ

Л.А. Франк<sup>1,2</sup>, Е.Е. Башмакова<sup>1</sup>, В.В. Красицкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

E-mail: lfrank@yandex.ru

Светоизлучающие (биолюминесцентные) белки – это ферменты (люциферазы и фотопротеины), катализирующие реакцию окисления субстрата (люциферина), одним из продуктов которой является видимый свет. Высокий квантовый выход этих реакций определил использование люцифераз как высокочувствительных репортеров в различных аналитических системах *in vitro* и *in vivo*. Разработка биолюминесцентного молекулярного анализа на основе целентеразин-зависимых люцифераз является одним из важных направлений исследований лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН.

Специфичность молекулярного анализа достигается за счет использования соответствующих высокоаффинных антител (иммуноанализ), гаптен (например, в системе биотин-стрепавидин), комплементарных олигонуклеотидов (гибридизационный анализ) и т. п. Сравнительно недавно в качестве таких биоспецифических элементов были предложены аптамеры – ДНК или РНК олигонуклеотиды небольшой длины (20-60 н.о.), обладающие уникальной пространственной структурой, которая формируется в результате образования локальных комплементарных дуплексов, стэкинг-взаимодействий, сети водородных связей. Оказалось, что среди них можно отыскать молекулы, с высокой аффинностью к молекуле-мишени, которые могут с успехом заменить антитела. При этом они обладают рядом преимуществ: простой способ получения химическим синтезом и *in vitro* селекцией, существенно меньшие размеры и сравнимая, а чаще более высокая аффинность и специфичность к самым разнообразным мишеням, в том числе и токсичным. Долгосрочной целью наших исследований было разработка молекулярного анализа, чувствительность и специфичность которого обеспечивается комбинацией биолюминесцентного репортера и аптамерной сенсорики.

В сотрудничестве с коллегами из лаборатории химии РНК (ИХБЭМ, Новосибирск) был разработан способ выявления патогенных аутоантител к основному белку миелина (анти-ОБМ-АТ) – одной из мишеней, ассоциированных с возникновением и развитием рассеянного склероза (РС), тяжелого аутоиммунного заболевания. Впервые был синтезирован конъюгат РНК-аптамера с  $Ca^{2+}$ -регулируемым фотопротеином обелином и показана перспективность его применения в качестве биолюминесцентного аптасенсора для выявления анти-ОБМ-АТ в сыворотках [1]. С использованием этого конъюгата, а также уникального РНК-аптамера для иммобилизации мишени из образца, был разработан твердофазный анализ сэндвич типа. Были исследованы около 200 клинических образцов сыворотки и показано, что анализ с высокой достоверностью (специфичность 94,2%) различает случаи клинически подтвержденного диагноза РС от здоровых пациентов. Показано, что анализ имеет диагностическую значимость и возможно его использование как одного из лабораторных тестов РС.

Способ выявления мишеней, ассоциированных с раком легкого, на основе пары ДНК-аптамеров и  $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротеина обелина был разработан недавно в сотрудничестве с коллегами из Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий КрасГМУ [2].

В настоящее время в лаборатории фотобиологии ведутся интенсивные работы по получению ДНК-аптамеров к одному из высокоспецифичных кардиомаркеров – тропонину I



и разработке высокочувствительного билюминесцентного анализа на их основе. Конечной целью этих исследований является создание быстрого и простого анализа этого маркера необходимого при диагностировании инфаркта миокарда.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 17-315-50027, а также государственным финансированием фундаментальных исследований РАН (проект № 0356-2017-0017).*

#### **Литература**

1. M.A. Vorobjeva, V.V. Krasitskaya, A.A. Fokina, V.V. Timoshenko, G.A. Nevinsky, A.G. Venyaminova, L.A. Frank. RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis. *Anal. Chem.* 2014, 86: 2590-2594.
2. Заявка на патент РФ № 2017136513 от 16.10.2017 2513686.

## **DESIGN IN BIOTECHNOLOGY: BIOLUMINESCENT BIOSENSORS**

**V.A. Kratasyuk<sup>1,2</sup>, E.N. Esimbekova<sup>2,1</sup>**

<sup>1</sup>*Siberian Federal University and Institute of Biophysics SB RAS, pr. Svobodnyi 79,  
Krasnoyarsk, 660041, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics SB RAS, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk 660036, Russia*

*E-mail: valkrat@mail.ru*

**Keywords:** bioluminescence, luciferase, enzymatic assay, immobilization, biotechnological design

Fundamental scientific problem that need to be solved is the problem of monitoring a variety of processes that have a direct connection to the pollution of the environment, such as the environmental safety and quality control of the water, soil and air. The searching of integral characteristics, which allow assessing the consequences of human impact on water, soil and air are very important. It was observed the trends of commonly use individual bioassays, which make wrong empirical results about the state of the environment and its influence on the individual as the main person of the biosphere. Another reason for getting wrong results during the bioassay analyzes is use living organisms and cultures, which can give a large measurement error.

A new methodology for the development of new bioluminescent methods for evaluating toxicity named by us biochemical (or biotechnological) design have been shown. The algorithm of biotechnological design of the bioluminescent methods and reagents for environmental monitoring of the water, soil and air has been shown. Methodological approaches can be different, because it can be developed as rapid non-specific methods and as a selective analysis which is based on the measurement of markers content in analyzed sample, where the markers are the substrates of bioluminescent reactions or enzymes involved in luciferase enzymatic chains.

New bioluminescent enzymatic biosensors, application to toxicity bioassays, and the needed reagents have been developed. To solve the problem of how to detect, identify, and measure the numerous chemical compounds in environmental monitoring, food product contamination, and medical diagnostics, bioluminescent enzymatic toxicity assays were proposed, wherein the bacterial coupled enzyme system NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase (Red + Luc) substitutes for older methods using living organisms [1-2].

The immobilized reagent Enzymolum was used to facilitate and accelerate the development of the bioluminescent enzymatic systems as biological part of biosensors for toxicological assays. It was shown that coupled enzyme system Red + Luc immobilized in starch or gelatin gel, saves its activity for 2 years. Moreover, immobilization in these gels leads to a considerable stabilization of the coupled enzyme system with regard to denaturation treatment: pH optimum of the enzymes

expands both to the acid and alkaline areas; high enzyme activity is maintained at increased salt concentration; thermal stability increases essentially, especially in case of starch gel immobilization.

Several substrates of bacterial bioluminescent reaction can be co-immobilized together with the coupled enzyme system to make the final test much simpler. For example, homogeneous multicomponent reagent named Enzymolum contains the enzymes Red and Luc, their substrates (myristic aldehyde and NADH) and buffer salts, co-immobilized in starch or gelatin gel [3]. The reagent is currently produced in flake form and can be used in the tube bioluminometer. The multicomponent reagent Enzymolum is a flake of dried gel, diameter 6–7 mm; dry weight  $1.5 \pm 0.2$  mg. The reagent is easy to use and convenient to be applied not only in toxicology studies but also in education, mainly in ecological and enzymological practical courses. Prototype biosensors offer cost advantages, versatility, high sensitivity, rapid response, extended shelf-life and flexible storage conditions [4-5]. The bioluminescent methods of analysis are applied to the integrated task of assessing the ecotoxicity.

*The research was supported by the Russian Science Foundation, project No 16-14-10115.*

#### References

1. Vetrova, E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova, E. Esimbekova, N. Rimmel, S. Kotova, N. Beloskov, V. Kratasyuk, I. Gitelson // *Luminescence*. – 2007. – V. 22: – N 3. – P. 206–214.
2. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // *Comb. Chem. High Through. Screen.* – 2015. – V. 18. – N 10. – P. 952–959.
3. Patent RU 2413772. Bioluminescent biomodul for analyses of various media toxicity and method of its preparation. Published on March 10, 2011.
4. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // *Environ. Monit. Assess.* – 2012. – T. 185. – N 7. – P. 5905-5916.
5. Esimbekova, E.N. Design of multicomponent reagents for enzymatic assays / E. N. Esimbekova, V. I. Lonshakova-Mukina, A. E. Bezrukikh, V. A. Kratasyuk // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2015. – V. 461. – N 4. – P. 102-105.

## **БЫСТРАЯ КИНЕТИКА $Ca^{2+}$ -РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНОВ: МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭМИТТЕРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ**

**Е.В. Еремеева, С.И. Барцев, Е.С. Высоцкий**

<sup>1</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия*

*E-mail: l\_ermeeva@mail.ru*

**Ключевые слова:** биоломинесценция, акворин, обелин, целентеразин, кинетика

Среди нескольких люцифериннов, найденных в морских организмах, наиболее широко распространен целентеразин и его производные. В природе целентеразин встречается как в светящихся, так и в несветящихся видах и идентифицирован как субстрат биоломинесцентной реакции различных организмов, например ряда кишечнорастворимых, мягкого коралла *Renilla*, креветки *Oplophorus*, копепод *Gaussia* и *Metridia* и других. С целентеразином работают как люциферазы, так и  $Ca^{2+}$ -регулируемые фотопротеины, которые содержат в активном центре преактивированное кислородом гидропероксипроизводное

целентеразина [1]. В результате биолюминесцентной реакции с участием целентеразина в качестве субстрата происходит его окислительное декарбоксилирование с образованием целентерамида в возбужденном состоянии. Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света. Шимомура и Тераниши в своей работе с аналогами целентерамида предложили, что целентерамид может формировать несколько различных возбужденных состояний: нейтральное с излучением при 400 нм, амид-анион (435-455 нм), фенолят-анион (480-490 нм) и пиразин-N4-анион, резонансная форма фенолят-аниона, с излучением при 530-565 нм [2]. Также была сформулирована proton-relay-гипотеза о том, как связывание ионов кальция с фотопротеинами инициирует окислительное декарбоксилирование субстрата, и о роли отдельных аминокислотных остатков белка в этом процессе [3]. Однако детальный механизм биолюминесцентной реакции фотопротеинов все еще требует уточнения.

До недавнего времени не существовало общей кинетической модели, которая хорошо описывала бы биолюминесцентную реакцию всего семейства  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов. Однако, в результате масштабных кинетических исследований пяти фотопротеинов – акворина из *Aequorea victoria*, клитина из *Clytia gregaria*, митрокомина из *Mitrocoma cellularia* и обелинов из *Obelia longissima* и *Obelia geniculata*, была предложена универсальная кинетическая модель биолюминесцентной реакции фотопротеинов, учитывающая явление положительной кооперативности связывания ионов кальция [4]. Следующим этапом стало исследование процесса формирования биолюминесцентных эмиттеров реакции фотопротеинов с использованием кинетических методов и математического моделирования.

Для кинетических исследований использовался метод остановленной струи, излучение регистрировалось с помощью спектрометра остановленного потока Applied Photophysics SX-20. Данный метод был выбран потому, что он позволяет определять кинетические параметры быстрых реакций со временем полужизни в несколько миллисекунд на заданных длинах волн. Для исследования динамики эмиттеров биолюминесцентной реакции фотопротеинов были выбраны обелин из *Obelia longissima* и его мутант W92F с нативным целентеразином, а также акворин из *Aequorea victoria* с нативным целентеразином и целентеразином-*e* (*e*-акворин). И мутация обелина W92F, и целентеразин-*e* существенно меняют соотношение эмиттеров в спектре биолюминесценции фотопротеина, увеличивая вклад от нейтральной формы возбужденного целентерамида.

Все исследованные белки демонстрировали одинаковый профиль кинетической кривой. После быстрого смешивания с кальцием наблюдалось резкое увеличение биолюминесцентного сигнала, максимум которого достигался в течение миллисекунд. Затем следовал медленный спад биолюминесценции, длящийся секунды. Однако константы скорости подъема и спада биолюминесцентной реакции, а также спектральные профили исследованных фотопротеинов существенно различались. Для акворинов с обоими субстратами было показано присутствие трех спектральных компонент, тогда как обелин и его мутант демонстрировали наличие четырех спектральных компонент во время-разрешенном спектре биолюминесценции. На основании полученных данных был произведен анализ кинетики отдельных спектральных компонент биолюминесцентной реакции выбранных фотопротеинов. Показано, что спектральные компоненты, отнесенные к определенным ионным состояниям целентерамида, формируются с примерно одинаковыми константами подъема для всех исследованных белков. Кроме того, анализ динамики спектральных компонент показал, что нейтральная форма целентерамида, по всей вероятности, не расходуется во время биолюминесцентной реакции. Это наблюдение позволяет усомниться в верности ранее сделанного предположения о том, что нейтральный

целентерамид является первичным эмиттером биолюминесцентной реакции фотопротеинов, из которого в свою очередь формируется фенолят-анион целентерамида.

Таким образом, анализ кинетики отдельных спектральных компонент биолюминесцентной реакции нескольких фотопротеинов с различными субстратами показал, что в спектре биолюминесценции фотопротеинов присутствуют три или четыре формы целентерамида, которые, по всей вероятности, формируются независимо друг от друга. Данный результат значительно усложняет моделирование биолюминесцентной реакции фотопротеинов, так как требует независимой обработки всех спектральных компонент и их интеграции в предложенную ранее универсальную кинетическую схему.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-04-00764 и темы государственного задания № 0356-2017-0017.*

### **Литература**

1. Shimomura, O. Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin / O. Shimomura, F.H. Johnson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – V. 75. – P. 2611–2615.
2. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // Luminescence – 2000. – V. 15. – P. 51–58.
3. Vysotski, E.S. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism / E.S. Vysotski, J. Lee // Acc. Chem. Res. – 2004. – V. 37. – P. 405–415.
4. Ereemeeva, E.V. Unanimous model for describing the fast bioluminescence kinetics of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins of different organisms / E.V. Ereemeeva, S.I. Bartsev, W.J. van Berkel, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93. – P. 495-502.

## **ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИЗОФОРМЫ MLUC164 ЛЮЦИФЕРАЗЫ METRIDIA, СИНТЕЗИРОВАННОЙ В E. COLI**

**Д.А. Горбунова<sup>1</sup>, С.В. Маркова<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

<sup>2</sup>*Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия*

*E-mail: smarkova@mail.ru*

**Ключевые слова:** биолюминесценция, биолюминесцентный репортер, люцифераза *Metridia*

Люцифераза из морских копепод *Metridia longa* – небольшой секретлируемый белок, представленный несколькими природными изоформами, катализирующими реакцию окисления целентеразина, сопровождающуюся излучением голубого света ( $\lambda=485$  нм) [1]. Каждая изоформа содержит по десять консервативных остатков цистеина, что предполагает наличие до пяти S-S-связей на молекулу люциферазы. Исследованные изоформы отличаются по структуре и свойствам, и, по-видимому, являются продуктами паралогичных генов. Изоформа MLuc164 является самой длинной из люцифераз *Metridia* (~22 кДа), была первой клонирована и описана, в связи с чем достаточно широко используется в качестве биолюминесцентного репортера в биомедицинских исследованиях. Несмотря на это, до настоящего времени свойства данной изоформы не были в достаточной мере охарактеризованы.

**Цель исследования** – получение люциферазы MLuc164 в нативной форме из телец включения *E.coli* путем окислительного рефолдинга и ее характеристикация.

**Результаты.** Для получения люциферазы клетки *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL, содержащие экспрессионную конструкцию pET22b+*mluc164*, культивировали в среде LB с ампициллином, при 37°C до стационарной фазы роста ( $OD_{600} = 1.2$ ). Индукцию синтеза проводили путем добавления 1 mM ИПТГ и культивировали еще в течение 1 часа при 37°C. Для получения активной люциферазы проводились следующие процедуры: очистка бактериальных телец включения (IB) путем последовательной промывки в растворах, содержащих 0,5 M NaCl и 0,5% Тритон X-100 для удаления гидрофобных контаминантов (Рис.1-2), при суспендировании с использованием ультразвукового дезинтегратора «Q700 Sonicator» (QSonica); растворение IB в 4M Гуанидин-HCl с добавлением 100 mM ДТТ, для полного восстановления внутри- и межмолекулярных S-S связей; процедуру восстановления белка проводили путем разведения денатурированного препарата MLuc164 в растворе для рефолдинга [2] в соотношении 1:30, при 4 °C, в условиях постоянного перемешивания. Для получения очищенного препарата люциферазы производили следующие хроматографии: обессоливание белка на колонке HiTrap (GE Healthcare), уравновешенной 20 mM Трис-HCl pH 8,5; катионообменная хроматография на колонке S-Sepharose, уравновешенной тем же буфером; гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенную 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 5% глицерином, 0,02% NP-40, 20 mM Трис-HCl, pH 8,5 (рис. 1 – 5, 6).

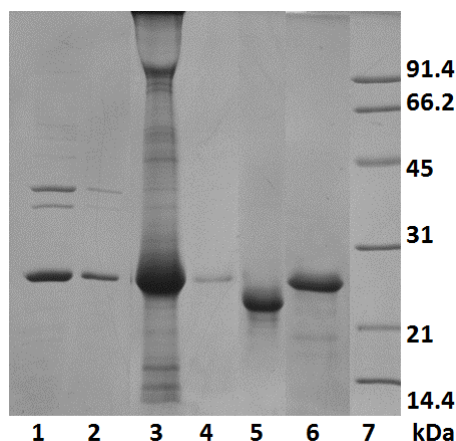


Рисунок 1 – SDS-PAAGE очистки MLuc164: 1 – IB, 2 – очищенные IB, 3 – IB в рефолдинговом растворе, 4 – препарат после ионообменной хроматографии на S-сефарозе, 5 – полунативный препарат после гель-фильтрации на колонке Superdex-75, 6 – препарат после гель-фильтрации на колонке Superdex-75, 7 – протеиновый стандарт

Полученный мономерный препарат люциферазы далее был использован для исследования люминесцентных свойств. Измерение спектра биолюминесценции показало  $\lambda_{\max}=488$  нм. Исследование температурной зависимости биолюминесцентной активности продемонстрировало оптимум биолюминесценции в районе 10-15°C (рис. 2) с довольно существенным падением активности при дальнейшем возрастании температуры. Несмотря на довольно низкий температурный оптимум биолюминесцентной активности, MLuc164 люцифераза выявляет экстремально высокую термостабильность с сохранением до 55% от начальной активности после 1 ч инкубации при 100°C. Вероятно, это благодаря наличию многих дисульфидных связей, стабилизирующих структуру. При наличии кинетики биолюминесцентной реакции типа «вспышка» показано, что добавление детергента (0.02% NP-40) в измерительный буфер существенно замедляет кинетику биолюминесцентной реакции MLuc164. Для понимания структурных особенностей белка были определены спектры собственной флуоресценции по остаткам триптофана и тирозина и сопоставлены с таковыми у изоформы люциферазы *Metridia* MLuc7[2], полученной из телец включения *E.coli*. При этом у обоих препаратов максимумы флуоресценции показали 330 и 303 нм, для

Trp и Tug соответственно, что говорит о том, что окружение активного центра одинаково у обоих белков (предполагается, что данные аминокислотные остатки входят в состав активного центра), несмотря на различия в их аминокислотных последовательностях.

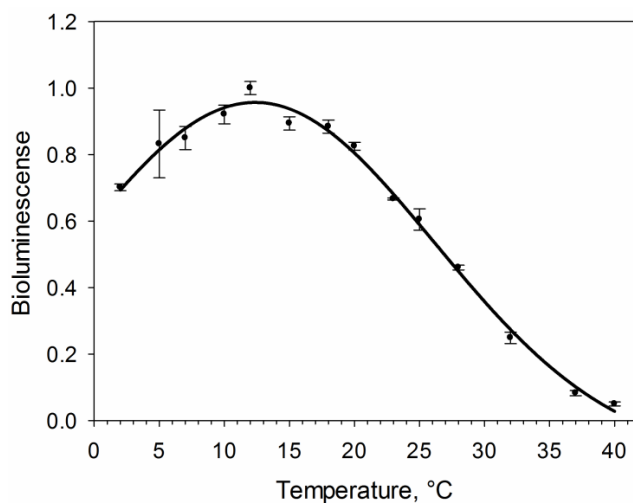


Рисунок 2 – Зависимость активности MLuc164 от температуры

**Заключение.** В ходе работы путем рефолдинга из телец включения *E.coli* был получен очищенный препарат активной нативной люциферазы MLuc164 (Рис. 1-6), а также исследованы ее основные люминесцентные свойства. Понимание свойств данной люциферазы позволит оптимизировать условия ее использования в качестве репортера. Так, например, при анализе следует учитывать низкий температурный оптимум активности люциферазы и использовать температурную стабилизацию при измерениях.

#### Литература

1. Маркова С.В., Высоцкий Е.С. Целентеразин-зависимые люциферазы // Биохимия. – 2015 – Т.80, № 6.– С. 845-866.
2. Markova S.V., Larionova M.D., Gorbunova D.A., Vysotski E.S. The disulfide-rich Metridia luciferase refolded from *E. coli* inclusion bodies reveals the properties of a native folded enzyme produced in insect cells // J. Photochem. Photobiol. B. – 2017. – V.175. – P. 51-57.

## ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ФОТОПРОТЕИНА БЕРОВИНА С ПОМОЩЬЮ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Л.П. Буракова<sup>1</sup>, Д.С. Демьянчук<sup>2</sup>, Е.С. Высоцкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

E-mail: burakoval@mail.ru

**Ключевые слова:** биолюминесценция, фотопротеины, целентеразин, гребневики, мутагенез

Целентеразин-зависимые Ca<sup>2+</sup>-регулируемые фотопротеины ктенофор излучают в зелено-голубой области спектра. Максимум излучения рекомбинантного фотопротеина беровина из гребневика *Beroe abyssicola* находится при 490 нм и не зависит от pH [1]. Поскольку фотопротеины широко используются в качестве индикаторов внутриклеточного

кальция, актуальной является задача получения таких белков с излучением в длинноволновой области спектра, для которого ткани живых организмов являются проницаемыми. Решение данной проблемы может быть достигнуто либо при использовании химических аналогов целентеразина, либо с помощью локальной замены аминокислотных остатков, расположенных в непосредственной близости от ОН-группы 6-*p*-гидроксифенильного кольца гидропероксицелентеразина. Ранее было показано, что замена N107W сдвигает максимум биолюминесценции беровина в длинноволновую область спектра на 45 нм, что, однако, сопровождается значительной потерей его активности [2]. При этом изоформы фотопротеина мнемипсина из гребневика *Mnemiopsis leidyi*, имеющие высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей с таковыми беровина, демонстрируют различия в спектрах биолюминесценции в зависимости от присутствия Ala или Ser в позиции 105, гомологичной позиции 106 в беровине [3].

В данной работе с помощью сайт-направленного мутагенеза исследована функциональная роль Ala106 в биолюминесценции беровина. В результате проведенного исследования выяснено, что замена A106S сдвигает максимум спектра биолюминесценции беровина на 9 нм (рисунок) в длинноволновую область, не снижая квантовый выход. При этом замена A106W, в отличие от N107W, практически не влияет на спектр биолюминесценции и выход активного фотопротеина, а замена A106D приводит к значительному снижению выхода активного белка.

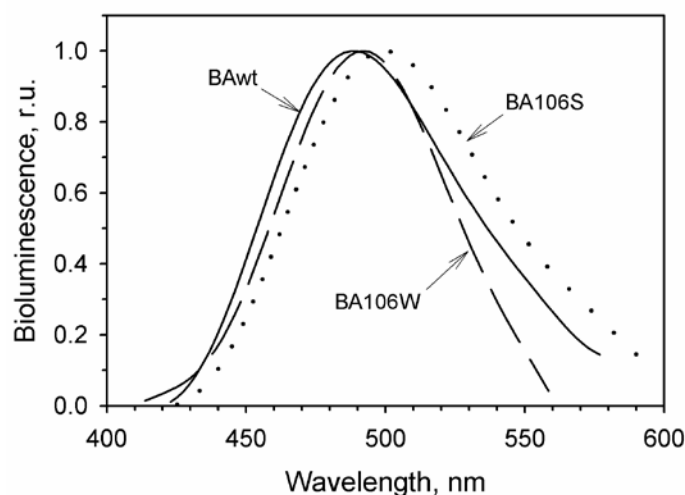


Рисунок – Спектры биолюминесценции беровина дикого типа BAwt (сплошная линия) и его мутантов с заменами A106W (пунктирная линия) и A106S (точки)

Оба мутанта демонстрируют низкую удельную активность. Это позволяет предположить, что ключевая роль в спектральных свойствах беровина принадлежит ОН-группе Ser106, которая может образовывать водородную связь с ОН-группой 6-*p*-гидроксифенильного кольца гидропероксицелентеразина и влиять на ее пространственное положение, что увеличивает вероятность образования ионных форм целентерамида в результате биолюминесцентной реакции.

**Заключение.** Результаты исследования показали, что аминокислотный остаток в позиции 106 в беровине определяет спектр его биолюминесценции, а появление аминокислоты с гидроксигруппой в боковом радикале может изменять положение находящегося поблизости 6-*p*-гидроксифенильного кольца, тем самым сдвигая максимум в длинноволновую область спектра. Используя эти данные, можно прогнозировать получение

мутантов беровина с измененным спектром биолюминесценции, в том числе и для аналитических задач.

*Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00764-а.*

### **Литература**

1. Markova S.V. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of Ca(2+) -regulated photoprotein / Markova S.V., Burakova L.P., Golz S., Malikova N.P., Frank L.A., Vysotski E.S. // FEBS J. – 2012. – 279. – P. 856-870.
2. Burakova L.P. Role of certain amino acid residues of the coelenterazine-binding cavity in bioluminescence of light-sensitive Ca(2+)-regulated photoprotein berovin / Burakova L.P., Stepanyuk G.A., Ereemeeva E.V., Vysotski E.S. // Photochem Photobiol Sci. – 2016. – 15. – P. 691-704.
3. Schnitzler C.E. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes/ Schnitzler C.E., Pang K., Powers M.L., Reitzel A.M., Ryan J.F., Simmons D., Tada T., Park M., Gupta J., Brooks S.Y., Blakesley R.W., Yokoyama S., Haddock S.H., Martindale M.Q., Baxevanis A.D. // BMC Biol. – 2012. – 10. – P. 107.

## **ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОДЕЛЬНЫХ СРЕД НА СТРУКТУРУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

**Л.А. Суковатый, А.А. Деева, Е.В. Немцева**

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*E-mail: suk-lev@yandex.ru*

**Ключевые слова:** бактериальная люцифераза, молекулярная динамика, вязкие среды, флавиномононуклеотид, сахароза, глицерин

Люцифераза – это фермент, играющий ключевую роль в биолюминесценции (процессе светоизлучения посредством химической реакции в живых организмах). Бактериальная люцифераза относится к классу монооксигеназ, она катализирует окисление восстановленного флавина и алифатического альдегида, в результате чего происходит испускание кванта света. Данный белок широко используется в биомедицинских исследованиях, экологическом мониторинге и биотехнологиях, так как с его помощью можно легко детектировать различные процессы, происходящие на молекулярном уровне.

На сегодняшний день многие аспекты функционирования бактериальной люциферазы не изучены, в том числе влияние микроокружения белка на эффективность биолюминесценции. Стоит отметить, что внутриклеточная среда представляет собой вязкую среду, состоящую из большого количества разных органических молекул. Ранние исследования эффектов, оказываемых вязкими средами на люциферазу, показали значительное изменение кинетических свойств фермента [1-2]. Для моделирования условий *in vivo*, как в экспериментальных, так и в теоретических исследованиях для повышения вязкости среды используются такие соразтворители, как сахароза и глицерин [3]. В данном исследовании для моделирования поведения бактериальной люциферазы в явном растворителе использовали метод молекулярной динамики (МД).

**Целью работы** являлось определение влияния вязких сред на структуру бактериальной люциферазы методами молекулярной динамики.



**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали кристаллическую структуру бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi* (BLuc, PDB ID:3FGC). Данная структура была расшифрована вместе с флавиномононуклеотидом (FMN) с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением в 2,3 Å. В качестве вязких соразтворителей были выбраны молекулы сахарозы (PDBeChem ID:SUC) и глицерина (PDBeChem ID:GOL). Всего было подготовлено девять систем с ферментом BLuc: в водном растворе без соразтворителей и в присутствии сахарозы и глицерина различной концентрации (10, 20, 30, 40 %). Модель каждой из систем представляла собой трехмерный «бюкс» с условиями периодической границы. Для описания параметров взаимодействия между атомами использовалось силовое поле CHARMM36 [4]. Подготовка систем, релаксация и вычисление молекулярной динамики были проведены с помощью программного обеспечения GROMACS 2016 [5].

Для каждой системы было проведено вычисление молекулярной динамики в течение 40 нс в условиях канонического ансамбля (1 атм, 300 К). Вычисление траектории для каждой системы проводили три раза и в анализе использовали усредненные значения траекторий.

**Результаты.** В работе проанализировано влияние вязких сред на структуру люциферазы. Расчет среднеквадратичного отклонения  $C_{\alpha}$  атомов белка от начальной конфигурации показал, что моделируемая система находится в состоянии равновесия, является стабильной и не подвергается значительным конформационным изменениям в течение 40 нс молекулярной динамики. Продемонстрировано, что смоделированное окружение люциферазы не оказывает влияние на радиус гирации белка, этот параметр не меняется на протяжении всего времени вычисления молекулярной динамики.

Для оценки подвижности функционально важных участков структуры люциферазы был рассчитан параметр среднеквадратичной флуктуации  $C_{\alpha}$  атомов аминокислотных остатков. Было показано, что аминокислотные остатки в активном центре люциферазы, отвечающие за взаимодействие с изоаллоксазиновым кольцом FMN менее подвижны в растворах с глицерином и сахарозой, чем в водном окружении. Подвижность участка мобильной петли и аминокислотных остатков, взаимодействующих с фосфатной группой флавина, уменьшается в растворах с глицерином и в то время как в присутствии сахарозы не изменяется либо увеличивается.

Выявлено, что количество водородных связей между поверхностью белка и молекулами глицерина растет пропорционально концентрации, в то время как для сахарозы наблюдается насыщение при концентрации >20%.

**Заключение.** Установлено, что повышение концентрации сахарозы/глицерина не приводит к существенным конформационным изменениям в структуре люциферазы. С другой стороны, снижение подвижности аминокислотных остатков активного центра белка при наличии соразтворителей может влиять на эффективность выполнения люциферазой ее функций. Отсутствие увеличения количества водородных связей между молекулами сахарозы и люциферазы с ростом концентрации соразтворителя может быть связано с уменьшением количества доступных для сахарозы сайтов связывания на поверхности белка. В тоже время, не было обнаружено пороговой концентрации, при которой происходит насыщение количества водородных связей в растворах глицерина. Вероятно, это связано с тем что, глицерин имеет меньше стерических ограничений для образования водородных связей с поверхностью белка.

### Литература

1. Close D. et al. The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (lux) as a real-time bioreporter // Sensors. – 2012. – V. 12. – №. 1. – P. 732-752.
2. Sutormin, O. et al. Effect of structured microenvironments on stability of coupled enzyme

system ADH:FMN-oxidoreductase–luciferase / O. Sutormin, I. Sukovataya, V. Kratasyuk // Luminescence – 2014. – V. 29 – P. 97–98.

3. Sekhar A. et al. Viscosity-dependent kinetics of protein conformational exchange: microviscosity effects and the need for a small viscogen // The Journal of Physical Chemistry B. – 2014. – Т. 118. – №. 17. – С. 4546-4551.

4. MacKerell Lab Homepage [Электронный ресурс] – Режим доступа: [http://mackerell.umaryland.edu/charmm\\_ff.shtml](http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml)

5. GROMACS Homepage [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.gromacs.org/>.

## ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА IL28B КАК МАРКЕРЫ УСПЕШНОСТИ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНОМ

Д.В. Лагутинская<sup>1</sup>, М.А. Столяр<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

<sup>2</sup>Филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»  
Минздрава России, Красноярск, Россия

E-mail: [dlagut1210@gmail.com](mailto:dlagut1210@gmail.com)

**Ключевые слова:** интерферон альфа, хронические миелопролиферативные новообразования, полиморфизмы гена IL28B

Интерферон альфа – лекарственный препарат, оказывающих выраженное противовирусное и противоопухолевое действие, однако обладающий большим количеством побочных эффектов [1].

С 2000-х годов известна роль полиморфизмов гена интерлейкина-28В (IL28B) в прогнозе эффективности лечения вирусного гепатита С данным препаратом. Наличие локусов TT (rs8099917) и CC (rs12979860) определяет максимально возможный положительный ответ на терапию. Генотип CC связан с позитивным прогнозом успеха терапии, а генотип TT – с высоким и устойчивым вирусологическим ответом [2]. Так же, наблюдаются различия во встречаемости полиморфизмов в зависимости от расы наибольшая частота не измененных вариантов гена наблюдается в азиатской популяции, а наименьшая – в африканской [3].

У пациентов с хроническими миелопролиферативными новообразованиями (ХМН) интерферон альфа применяется как один из препаратов первой линии у молодых пациентов, что связано с высокой токсичностью и тяжелой переносимостью при длительном приеме. Ответ на терапию оценивается по критериям выраженности симптомов заболевания, а также гематологическим и молекулярно-генетическим показателям. Для данной группы пациентов до недавнего времени прогностическая роль полиморфизмов гена IL28B не была исследована.

**Цель работы:** изучение роли полиморфизма IL28B как прогностического фактора эффективности лечения интерфероном  $\alpha$ .

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлась ДНК из архива биоматериала Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Образцы ДНК были выделены из крови 19 пациентов с истинной полицитемией (возраст от 20 до 74 лет), 11 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (возраст от 26 до 61 лет), 5 пациентов с первичным

миелофиброзом (возраст от 51 до 66 лет), данные о распространенности полиморфизмов rs12979860 и rs8099917 среди здоровых людей были взяты из литературного источника [4]. Полиморфизмы гена IL28B были определены методом пиросеквенирования с использованием прибора «PyroMark Q24» и реагентов "Интерлабсервис".

**Результаты.** Частота встречаемости полиморфизмов rs12979860 и rs8099917 у пациентов с ХМН и у здоровых добровольцев статистически не отличается ( $p=0,19$  и  $p=0,66$  соответственно), что свидетельствует об отсутствии влияния данных полиморфизмов на вероятность развития данного заболевания.

Влияние токсичности интерферона оценивалось по длительности его приема как показателя общей переносимости курса терапии. На рис. 1 показано, значимое увеличение продолжительности приема препарата у пациентов с гаплотипом GT.

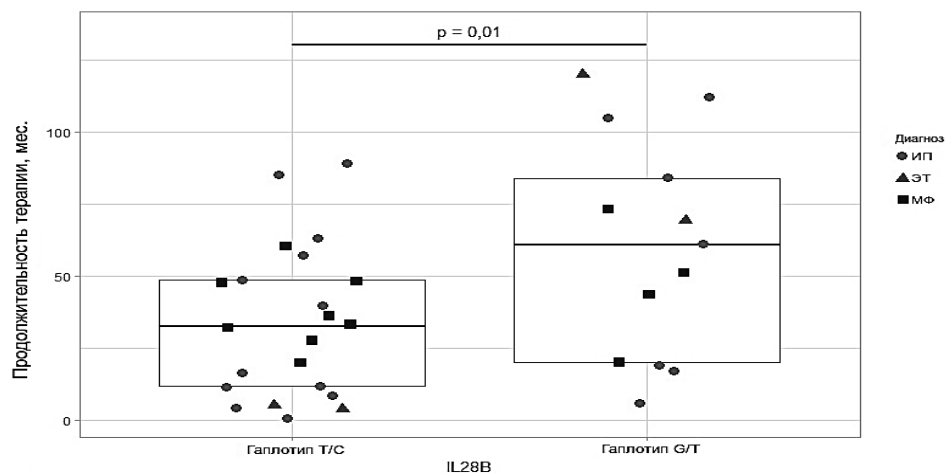


Рисунок 1 – Значимое увеличение продолжительности приема препарата у пациентов с гаплотипом GT

Молекулярный ответ на терапию оценивался по аллельной нагрузке мутации V617F гена JAK2 в течение терапии. Из представленных данных на рис. 2 следует, что обладатели данного гаплотипа также достигали более устойчивого молекулярно-генетического ответа на терапии интерфероном.

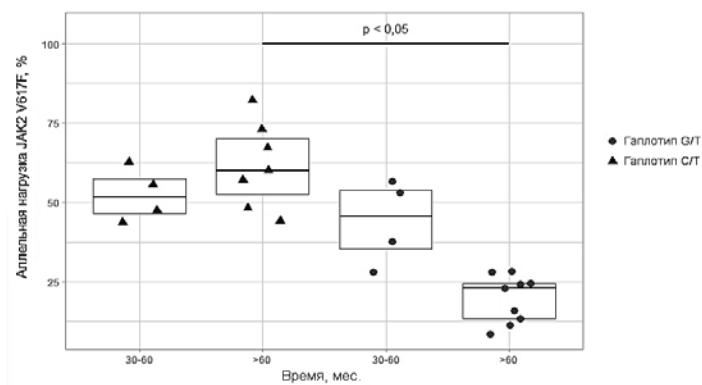


Рисунок 2 – Результаты аллельной нагрузке мутации V617F гена JAK2 в течение терапии

Установлено, что частота встречаемости полиморфизмов rs12979860 и rs8099917 у пациентов с ХМН и у здоровых добровольцев не отличается. У 92% пациентов выявлено

сцепленное наследование данных полиморфизмов, что позволяет говорить о роли гаплотипа в опосредовании эффекта терапии интерфероном. Установлено, что наличие мутантной аллели, хотя бы по одному из полиморфизмов, характерно более продолжительное время приема интерферона. Отмечено влияния мутантного гаплотипа на снижение аллельной нагрузки мутации V617F/JAK2.

Таким образом, мутантная форма IL-28B способствует не только понижению токсического эффекта препарата, но и повышает его эффективность.

### **Литература**

1. Альтевир® (Altevir) [Электронный ресурс] : Регистр лекарственных средств России. – Режим доступа: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_31004.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_31004.htm).
2. Cheng, C-H. High frequencies of a favorable IL-28B rs8099917 polymorphism and the clinical implications in patients with HCV in one multiracial area of Taiwan / C-H. Cheng [и др.] // Kaohsiung Journal of Medical Sciences. – 2017. – № 20. – P. 1–6.
3. Echeverría, N. IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients / N. Echeverría [и др.] // Virology Journal. – 2018. – V. 15, № 40. – P. 1–10.
4. Susser, S. Predictive Value of Interferon-Lambda Gene Polymorphisms for Treatment Response in Chronic Hepatitis C / S. Susser [и др.] // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, № 11. – P. 1–11.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ WT1 И HMGA2 ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

**Н.С. Белевцова**

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» МЗ РФ, Россия, Красноярск*

*E-mail: natashabelevtsova9a@mail.ru*

**Ключевые слова:** Хронические миелопролиферативные заболевания, экспрессия мРНК WT1, экспрессия мРНК HMGA2

**Введение.** Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) являются результатом злокачественной трансформации кроветворных клеток костного мозга [1] и включают три основные клинические варианты: истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). Известно, что у 6% пациентов с ИП и у 5% с ЭТ в течение первых 10 лет с момента постановки диагноза наблюдается прогрессия основного заболевания в миелофиброз (МФ) [2]. Известен также факт значительного увеличения уровня экспрессии мРНК генов WT1 и HMGA2 в опухолевых тканях, в том числе и в клетках крови при лейкозах. Вместе с тем, изучению прогностического значения экспрессии данных генов для пациентов с ХМПЗ посвящены лишь единичные публикации [3–5].

**Цель работы** – исследование уровня экспрессии мРНК онкогенов WT1 и HMGA2 в архивных образцах крови пациентов с ХМПЗ.

**Материалы и методы.** В исследование были включены пробы 29 пациентов с ИП (в возрасте от 30 до 74 лет, 13 женщин и 16 мужчин), 16 пациентов с ЭТ (в возрасте от 26 до 79 лет, 10 женщин и 6 мужчин), 17 пациентов с диагнозом МФ (в возрасте от 47 до 79 лет, 10

женщин и 7 мужчин) и 28 здоровых добровольцев (в возрасте от 22 до 38 лет, 18 женщин и 10 мужчин), составляющих группу контроля. Выделение РНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием набора реагентов «РИБО-золь-D», далее проводилась обратная транскрипция с использованием реагентов «Реверта-L». Количественная экспрессия мРНК WT1 и HMGA2 определялась методом ПЦР в «режиме реального времени» с использованием TaqMan зондов и наборов реактивов производства ООО «Формула гена» на амплификаторе CFX96 («BioRad»).

**Результаты.** Обнаружено, что ни у одного из здоровых добровольцев контрольной группы экспрессия мРНК гена WT1 в пробах цельной крови не выявлялась. У пациентов с МФ экспрессия мРНК гена WT1 детектировалась в 19 пробах (59%). В 5 из 12 (42%) случаях повторного тестирования пациентов рост уровня экспрессии мРНК гена WT1 сопровождался ухудшением гематологической картины крови.

Экспрессия мРНК гена HMGA2 в группе контроля не превышала уровень 0,21 отн. ед. (референсный диапазон составил 0,01-0,18 отн. ед.), в то время как у 14 пациентов с ХМПЗ превышала уровень 0,18 отн. ед. что составляет 14% от общего числа пациентов. Повышенный уровень экспрессии мРНК гена HMGA2 также сочетался с более выраженной прогрессией заболевания.

**Заключение.** Выявленное повышение уровня мРНК генов WT1 и HMGA2 ассоциировано с прогрессией заболевания и риском неблагоприятного исхода. Количественное определение уровня экспрессии генов WT1 и HMGA2 играет важную роль в патогенезе и может быть использовано в качестве диагностических маркеров.

### Литература

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Миелопролиферативные заболевания. М.: литтера; 2016.
2. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer Journal*. 2015; 5(11):e366.
3. Marjanovic I, Karan-Djurasevic T, Ugrin M, Virijevic M, Vidovic A, Tomin D, Suvajdzic Vukovic N, Pavlovic S, Tomic N. Use of Wilms Tumor 1 Gene Expression as a Reliable Marker for Prognosis and Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17(5):312-319.
4. Tan L, Wei X, Zheng L, Zeng J, Liu H, Yang S, Tan H. Amplified HMGA2 promotes cell growth by regulating Akt pathway in AML. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016; 142(2):389-399.
5. EVA BARRAGÁN. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia /EVA BARRAGÁN, JOSÉ CERVERA, PASCUAL BOLUFER, SANDRA BALLESTER, GUILLERMO MARTÍN, PASCUAL FERNÁNDEZ, ROSA COLLADO, MARÍA JOSÈ SAYAS, MIGUEL ANGEL SANZ // *Acute Myeloid Leukemia*. – 2004. №89, P. 926-933.

## **CELL CYCLE-SPECIFIC ACCUMULATION OF 5-HYDROXYMETHYLURACIL ON ALPHA SATELLITES INDICATES ITS POTENTIAL ROLE IN ESTABLISHMENT OF CENTROMERIC CHROMATIN IN HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS.**

**Abakir, T. Giles, D. Gackowski, J. Crutchley, D. Alves Moreira da Silva, E. Prokhortchouk, C. Denning, R. Emes, R. Olinski\* and A. Ruzov\***

*School of Medicine, University of Nottingham, Nottingham, UK*

*E-mail: alexey.ruzov@nottingham.ac.uk*

5-Hydroxymethyluracil (5hmU) is an enigmatic DNA modification that has previously been regarded as a by-product of normal cellular metabolism in mammals. A recent study demonstrated that 5hmU is produced via oxidation of thymine by Ten-eleven Translocation (TET) enzymes in the DNA of mouse embryonic stem cells (ESCs). Although this finding implied that 5hmU may act as a bona fide epigenetic mark in ESCs, potential biological roles of this modification are currently unclear. Here, employing sensitive mass spectrometry we show that 5hmU is accumulated in the DNA of human pluripotent stem cells (hPSCs) during mitosis. In line with this, our immunostaining experiments and genome-scale profiling of 5hmU reveal predominant association of this modification with centromeric alpha satellites in hPSCs. Moreover, we demonstrate that 5hmU is enriched not only at tandem repeats-containing centromeres but also at the centromeres comprised of non-tandem-repetitive sequences in chicken DT40 cell line. Collectively, our data indicate cell-cycle-specific and likely alpha satellite-independent association of 5hmU with centromeric chromatin and suggest that this modification may potentially be involved in epigenetic determination of centromeres in vertebrates.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗРАСТНОГО СОСТАВА ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ И КОНЦЕНТРАЦИИ ГОРМОНА ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ПАТОЛОГИИ ДИФфуЗНЫЙ ТОКСИЧЕСКИЙ ЗОБ**

**В.А. Беглякова, Ф.А. Гершкорон**

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*E-mail: jortarn.roga@gmail.com*

**Ключевые слова:** тироксин, диффузный токсический зоб, эритроциты, стресс

В последние годы в инфраструктуре эндокринных заболеваний неуклонно возрастает число больных с диффузным токсическим зобом (ДТЗ). По данным литературы, среди заболеваний щитовидной железы диффузный токсический зоб составляет от 10 до 20 % [1]. Как правило, женщины болеют в 5–10 раз чаще мужчин. ДТЗ манифестирует в молодом и среднем возрасте [2]. ДТЗ – это аутоиммунное заболевание, обусловленное избыточной секрецией тиреоидных гормонов диффузной тканью щитовидной железы.

Повышенный интерес к эритроцитам при болезнях разного генеза обусловлен их участием в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза целого организма. Эритроциты являются важнейшим звеном механизма иммунорегуляции при стрессе и в условиях патологии [3].

При ДТЗ может быть выявлено усиление эритропоэза под влиянием повышенной концентрации тироксина.

**Цель работы:** исследовать возрастной состав эритроцитов крови и концентрацию гормона тироксина в сыворотке крови при ДТЗ.

**Материалы и методы.** Объект исследования – цельная кровь с патологией диффузный токсический зоб и выделенная из неё сыворотка. Забор крови проводили из локтевой вены натошак у пациентов. Исследована 31 проба, полученная от женщин, больных диффузным токсическим зобом, в возрасте от 24 до 76 лет.

Для обработки результатов исследования, все пробы были разделены на две группы: до (n = 19, возраст от 24 до 48 лет) и после (n = 12, возраст от 49 до 76 лет) менопаузы (МП). Возрастной границей служил возраст 49 лет – усреднённое значение, при котором у женщин начинается менопауза.

Были использованы следующие методы:

- метод химических (кислотных) эритрограмм для определения возрастного состава эритроцитов;
- иммуноферментный анализ для определения концентрации общего тироксина в сыворотке крови.

**Результаты** представлены в виде таблицы и рисунка.

У женщин до и после менопаузы при ДТЗ отмечен рост повышённостойких эритроцитов, что свидетельствует об усиленном эритропоэзе под влиянием повышенного уровня свободного тироксина при данной патологии.

Таблица – Возрастной и процентный состав эритроцитов

Виды эритроцитов по стойкости	Возраст эритроцитов, дни	Содержание эритроцитов в норме, %	Содержание эритроцитов у женщин при ДТЗ до МП, %	Содержание эритроцитов у женщин при ДТЗ после МП, %
Понижено-стойкие	Более 90	20-25	10	21
Среднестойкие	30-90	45-55	49	48
Повышенно-стойкие	До 30	20-25	41	31

При этом на фоне повышенного тироксина у женщин до и после менопаузы при ДТЗ концентрация общего тироксина находится в пределах нормы.

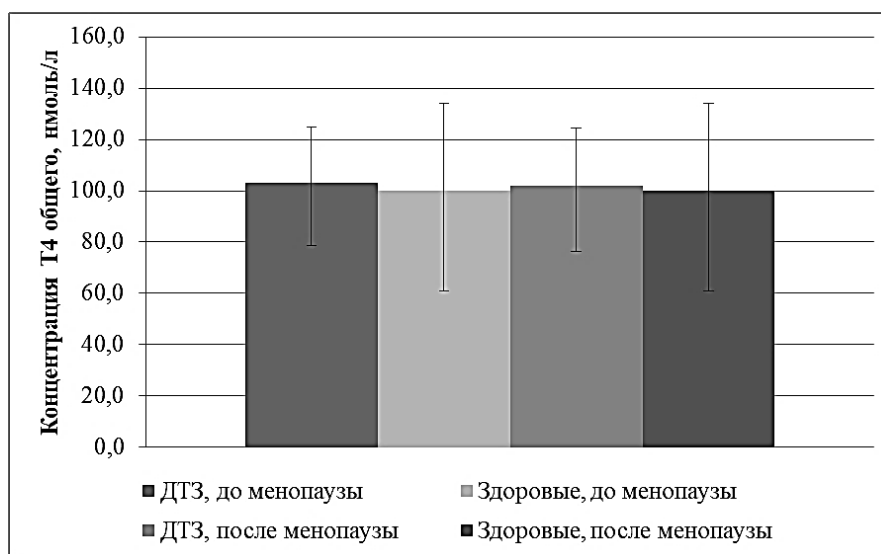


Рисунок – Концентрация общего тироксина у женщин при ДТЗ (до и после менопаузы) в сыворотке крови

Выявлена корреляционная зависимость между концентрацией общего тироксина и количеством пониженностойких эритроцитов у женщин больных ДТЗ после менопаузы; коэффициент корреляции составил -0,5.

### Литература

1. Агаев, Р. Прогнозирование отдаленных результатов хирургического лечения диффузно-токсического зоба / Р. Агаев, А. Агаева, Л. Сафарова, С. Юсифов, С. Ахмедова // Онкология XXI век. – 2016. – С. 28–33.

2. Стяжкина, С. Н. Анализ данных о распространенности больных с диффузным токсическим зобом по Удмуртской Республики / С. Н. Стяжкина, А. В. Бурцева, В. Р. Березина, М. Р. Вагизова // Современные тенденции развития науки и технологий. – 2016. – №1–3. – С. 111–113.

3. Азарова, Ю. Э. Структурно-функциональные и иммуномодулирующие свойства эритроцитов в условиях острого билиарного и небилиарного панкреатита: научная статья / Ю. Э. Азарова, С. А. Долгарева, А. Л. Локтионов. – Санкт-Петербург : Медицинская Иммунология. – 2011. – Т. 13. – №4–5. – 480 с.

## HEAT SHOCK PROTEIN 90 AS POTENTIAL STRESS AND CANCER BIOMARKER

**R. Ranjan**

*Fermentation Technology and Bioengineering Department, CSIR – Central Food Technological Research Institute, Mysore, India*

*E-mail: rajeev694@gmail.com*

**Keywords:** HSP90; ATP bioluminescence; cancer biomarker; biosensor

Heat shock protein 90 (HSP90) is an abundantly distributed molecular chaperone which plays a pivotal role in maintaining protein structures. HSP90 assists cancer cells in the maturation of proteins and show enhanced ATPase activity in malignant tissues and stressed cells. Therefore, HSP90 has emerged as a potential biomarker for stress and cancer, whose elevated serum/saliva levels can be monitored using bioluminescence based assays.

HSP90 is a homodimer; each monomer has an N-terminal adenosine 5'-triphosphate (ATP)-binding domain (N-domain), a charged region of variable length, a middle domain (M-domain) with binding sites for client proteins and co-chaperones and a C-terminal dimerization domain (C-domain). Hsp90 has an open “V” conformation under ATP free conditions, which changes to a closed conformation following ATP binding and subsequent decay.

In the present research, ATP solutions (<1  $\mu\text{M}$ ) were incubated with varying HSP90 (<22  $\mu\text{M}$ , specific activity:  $\geq 8$  nM) at different temperatures (4-70  $^{\circ}\text{C}$ ) and incubation time for determining the ATPase activity of HSP90 using ATP bioluminescence assay. The preliminary results were found to be strikingly different from the existing research reports. HSP90 led ATP incubation showed increment in the measured luminescence instead of luminescence decay. Further, research is underway for conclusive findings.

*The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research [Project No 16-34-60100]*



## References

- [1] Ishida, M., Tomomari, T., Kanzaki, T., Abe, T., Oka, T., & Yohda, M. (2013). Biochemical characterization and cooperation with co-chaperones of heat shock protein 90 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116 (4), 444-448.
- [2] Siegelin, M. D. (2013). Inhibition of the mitochondrial Hsp90 chaperone network: a novel, efficient treatment strategy for cancer?. *Cancer letters*, 333(2), 133-146.
- [3] Bauer, S., Lynn, K. Y., Demetri, G. D., & Fletcher, J. A. (2006). Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer research*, 66 (18), 9153-9161.
- [4] Csermely, P., & Kahn, C. R. (1991). The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (8), 4943-4950.

## DIFFERENTIAL ROLE OF DIETARY FIBERS AND CALORIE RESTRICTION ON SIRTUIN PROTEIN

S. Pande

*Fermentation Technology and Bioengineering Department, CSIR – Central Food Technological Research Institute, Mysore, India*

*E-mail: drshubhrapane@gmail.com*

**Keywords:** Sirtuins, NAD<sup>+</sup>, biomarker, dietary fibers, calorie restriction, bioluminescence.

Sirtuin are NAD<sup>+</sup> dependent protein which has emerged out as a potential biomarker for ageing. These proteins were reported to perform ADP-ribosyltransferases activity and protein deacetylation. Recently, there have been a plethora of research investigations which have indicated strong links between calorie restriction and sirtuin levels. The amount of nutrient availability is sensed by these proteins (seven mammalian sirtuins have been reported so far) and regulate metabolic processes such as glycolysis, gluconeogenesis and insulin sensitivity. Sirtuins deacetylate the nuclear receptor, causing their inhibition that activates adipogenesis or fat synthesis in the body, enabling favorable cellular and health changes. Sirtuins also mediate positive intracellular response that promotes DNA damage repair and cell survival, thereby enhancing the longevity of cells. Sirtuin activity also brings a wide spectrum of other health benefits and its activity levels are indicative of nutritional status as well. Their levels have also been affected during disease progression in cancer, inflammation, obesity, cardiovascular diseases, and viral infections. However, there is a poor relationship between nutrient intake and existing nutritional biomarkers. In this regard, we are investigating the role of dietary fibers in regulating the sirtuin levels since dietary fibers simulate the conditions of calorie restriction. The study will be conducted through animal experiments using male wistar rats that will be grouped into three having eight candidates in each and their dietary pattern will be designed accordingly. Their sirtuin levels will be analysed using analytical methods preferably bioluminescence based.

*The research was supported by the Russian Ministry of Education, Post-Doctoral Program of Project “5-100” [Grant No. M 2.2.3] and the Russian Foundation for Basic Research [Project No 16-34-60100].*

## ОТБОР ДНК-АПТАМЕРОВ К ТРОПОНИНУ I

Н.С. Гончарова<sup>1</sup>, Е.Е. Башмакова<sup>2</sup>, В.В. Красицкая<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия

E-mail: jeyn\_a@bk.ru

**Ключевые слова:** ДНК-аптамеры, кардиомаркеры, тропонин I, биолюминесцентный анализ, фотопротейн обелин

**Введение.** Сердечный тропонин I – структурный белок, присутствующий исключительно в сердечной мышце. Тропонин I является одним из высокоспецифичных кардиомаркеров, поскольку появление данного белка в периферической крови свидетельствует о повреждении кардиомицитов при инфаркте миокарда. Низкие диагностические уровни данного кардиомаркера (от 0,01 мкг/л) предъявляют высокие требования к чувствительности методов для его обнаружения [1].

В качестве альтернативы антителам, как биоспецифическим элементам, в настоящее время предлагаются ДНК аптамеры – короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, способные с высокой аффинностью связываться с молекулами различной природы [2]. При этом в сравнении с антителами ДНК аптамеры просты в получении и зачастую имеют более высокую аффинность, чем антитела.

Рекомбинантный фотопротейн обелин гидроидного полипа *Obelia longissima* – высокочувствительный репортер, подходящий для выявления мишеней в низких концентрациях. Благодаря высокому квантовому выходу реакции и низкому уровню фонового свечения обелин обнаруживают в аттомолярных количествах. Биолюминесцентный сигнал этого белка в виде короткой вспышки возникает при присоединении ионов кальция, его величина не зависит от наличия субстрата или каких-либо кофакторов и при избытке  $Ca^{2+}$  линейно связана с концентрацией мишени. В настоящее время рекомбинантный обелин и его генно-инженерные варианты с разными характеристиками биолюминесцентного сигнала – доступные стабильные белки, что позволяет применять их как репортеры в составе химических конъюгатов с различными биоспецифическими молекулами.

**Цель работы:** получение ДНК-аптамеров, аффинных к сердечному тропонину I, пригодных для создания биолюминесцентного биосенсора.

**Материалы и методы:** отбор аффинных аптамеров к тропонину I осуществляли с использованием синтетической библиотеки одноцепочечных ДНК (оц ДНК) (SangonBiotech, Китай) и технологии SELEX [3]. Были проведены 12 раундов отбора, каждый из которых включал: 1) инкубацию с тропонином I исходной библиотеки оц ДНК в первом раунде отбора или обогащенного варианта библиотеки после предыдущего раунда; 2) отмывку аптамеров, не связавшихся с тропонином I; 3) экстракцию связавшихся с тропонином I аптамеров денатурацией; 4) амплификацию обогащенной библиотеки аптамеров с помощью симметричной либо ассиметричной ПЦР. Для увеличения специфичности аптамеров обогащенную после разных раундов библиотеку подвергали негативному отбору. При этом в качестве мишени вместо тропонина I выступали тропонины T и C, человеческий сывороточный альбумин, миоглобин и креатинкиназа. Для дальнейшего отбора использовали аптамеры, не обладающие аффинностью к данным белкам. С использованием ПЦР и биотинилированного праймера для дальнейшего анализа были получены последовательности обогащенной библиотеки ДНК после разных раундов селекции с биотином на 5' конце.

**Результаты.** Для мониторинга процесса обогащения ДНК библиотеки последовательностями, аффинными к тропонину I, был разработан биолюминесцентный твердофазный анализ на основе химически синтезированного конъюгата фотопротеина обелина с антителом к тропонину I (рис., а).

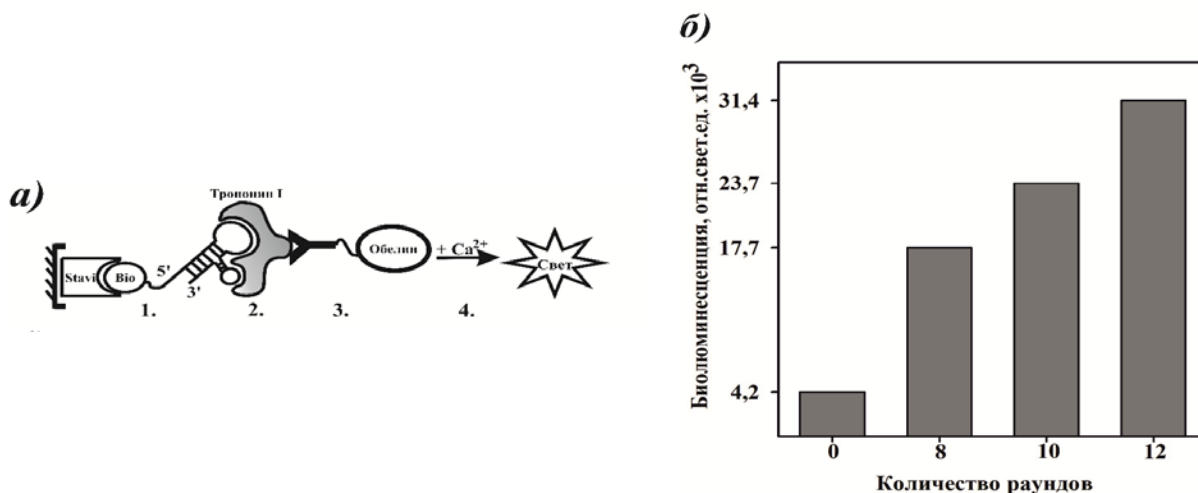


Рисунок – а – анализ обогащения ДНК-библиотек в ходе селекции. 1 – связывание биотинилированных последовательностей оцДНК со стрептавидином (Stavi), иммобилизованным в лунках планшета; 2 – аффинное взаимодействие ДНК-последовательностей с тропонином I; 3 – связывание с тропонином I конъюгата обелина с соответствующими антителами; 4 – измерение биолюминесценции обелина при добавлении Ca<sup>2+</sup>. Bio – биотин; б – результат анализа

Величина биолюминесцентного сигнала обелиновой метки увеличивается в ходе отбора, что свидетельствует об увеличении относительного содержания последовательностей ДНК, аффинных к тропонину I (рис. 1, б). Образец ДНК библиотеки после 12-го раунда отбора отправлен на секвенирование для установления нуклеотидной последовательности и последующего отбора индивидуальных аптамеров.

*Исследование выполнено при поддержке РФФИ, проект № 18-38-00531.*

#### Литература

1. Fathil, M. F. M., Md Arshad M. K., Gopinath C. B., Hashim U., Adzhriv R. Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac Troponin biomarkers // Biosensors and Bioelectronics. 2015, 70, 209–220.
2. Song, K-M., Lee S., Ban C. Aptamers and their biological applications // Sensors. 2012, 12, 612–631.
3. Darmostuk M., Rimpelova S., Gbelcova H., Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology // Biotechnology Advances. 2015, 33.

## ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА RS 7785846 (С/Т) В ГЕНЕ PON2 В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

А.Д. Юшкова<sup>1</sup>, Л.А. Франк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия

E-mail: nastya\_y97@mail.ru

**Ключевые слова:** фотопротейн обелин, профессиональная нейросенсорная тугоухость, параоксоназа-2 (PON2), однонуклеотидный полиморфизм (SNP), биолюминесцентный способ генотипирования SNP

**Введение.** По данным Роспотребнадзора каждый пятый работающий подвергается воздействию производственного шума, и число ежегодно выявляемых случаев профессиональной нейросенсорной тугоухости растет. Особое социальное значение проблемы связано с тем, что профессиональная тугоухость развивается в основном среди лиц трудоспособного возраста (42-49 лет) при стаже работы 10-14 лет и нередко ведет к инвалидизации. В этом аспекте задача выявления генетической предрасположенности к этому заболеванию является актуальной.

Фермент параоксоназа-2 (PON2) относится к семейству гидролаз, повсеместно экспрессируется в тканях по всему телу и оказывает антиоксидантное действие на клеточном уровне. В исследованиях, проведенных в итальянской и китайской популяциях, показано, что наличие однонуклеотидных полиморфизмов в гене PON2, кодирующем этот фермент, связано с развитием частичной потери слуха, индуцируемой шумом [1, 2]. В частности, полиморфизм rs 7785846 (C/T) в гене PON2 ассоциировался с двухкратным повышением риска развития тугоухости, вызванной шумом [1].

**Цель работы:** выявление однонуклеотидного полиморфизма rs 7785846 (C/T) в гене PON2, и изучение его ассоциации с риском развития частичной потери слуха, вызванной шумом, у лиц, работающих во вредных условиях на предприятиях Красноярска.

**Материалы и методы.** Полиморфизм выявляли с помощью разработанного ранее биолюминесцентного способа выявления SNP. Принцип этого способа представлен на рисунке. Он включает три основных этапа: 1) реакцию ПЦР для синтеза ДНК фрагментов, фланкирующих полиморфный сайт; 2) реакцию удлинения аллель-специфичных праймеров (PEXT), несущих соответствующую якорную группу на 5'-конце (FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, или A<sub>27</sub> – олигоаденилат); 3) выявление продуктов PEXT-реакции с помощью твердофазного биолюминесцентного анализа. Критерием для определения генотипа является значение дискриминационного фактора D, равного соотношению биолюминесцентных сигналов репортеров, связанных с соответствующими аллелями гена.

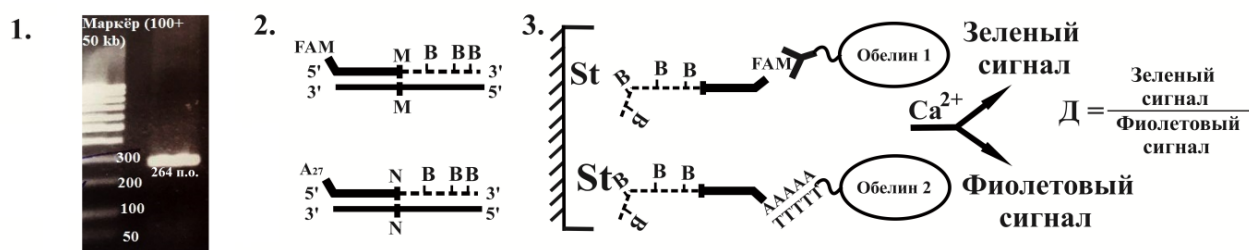


Рисунок – Биолюминесцентный способ выявления SNP

Определение генотипа проводили относительно значения фактора D контрольного образца (фрагмент ДНК с генотипом мутантная гомозигота, установленным биолюминесцентным анализом и подтвержденным независимым секвенированием по Сэнгеру). Значения D для разных генотипов отличались более чем на порядок, что определяет достоверность проведенного анализа.

**Результаты.** В исследовании принимали участие проанкетированные и аудиометрически обследованные 312 человек, работающих в цеху. Основным критерием для формирования выборок была работа в условиях шума не менее 1 года. Работники с хроническими заболеваниями органов слуха, травмой головы, перенесшие менингит и имеющие случаи нарушения слуха в семейном анамнезе, были исключены из исследования.

При анализе распределения генотипов исследуемой мутации не было выявлено статистически значимого различия между экспериментальной и контрольной группами (табл. 1).

Таблица 1 – Частота генотипов в экспериментальной и контрольной группах

SNP (ген)	Экспериментальная группа, N=146		Контрольная группа, N=166		ОШ (95% ДИ)	p
	генотип	N (%)	генотип	N (%)		
7785846 (PON 2)	CC	76 (52)	CC	82 (49,4)	1,11 (0,71-1,74)	0,58
	CT	54 (37)	CT	63 (38)	0,96 (0,61-1,52)	
	TT	16 (11)	TT	21 (12,6)	0,85 (0,43-1,70)	

Сравнение так же проводилось между группами рабочих, со стажем работы в условиях повышенного шума от 5 до 16 лет. При данном стаже возникающая тугоухость, не обусловлена возрастными и прочими изменениями органов слуха. Экспериментальная и контрольная группы достоверно не отличались по полу, возрасту и стажу ( $p > 0,05$ ) и работали в одинаковых условиях. При анализе распределения генотипов не было выявлено статистически значимого различия между экспериментальной и контрольной группами (табл. 2).

Таблица 2 – Частота генотипов в экспериментальной и контрольной группах работников со стажем работы в условиях шума от 5 до 16 лет

SNP (ген)	Экспериментальная группа, N=54		Контрольная группа, N=117		ОШ (95% ДИ)	p
	генотип	N (%)	генотип	N (%)		
7785846 (PON 2)	CC	28 (51,8)	CC	56 (47,9)	1,17 (0,62-2,24)	0,89
	CT	17 (31,5)	CT	48 (41)	0,66 (0,33-1,31)	
	TT	19 (35,2)	TT	13 (11,1)	1,60 (0,64-4,01)	

**Заключение:** в исследуемой группе лиц, работающих во вредных условиях на предприятиях Красноярска, связь полиморфизма rs 7785846 в гене параоксоназы-2 с риском развития профессиональной нейросенсорной тугоухости не выявлена.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (проект № 16-44-242097).*

### Литература

1. Li, X., Cao, J., Wang, J., Song, H., Ji, G., Dong, Q., Wei, C., Cao, Y., Wang, B., Zhu, B., Xiao, H. PON2 and ATP2B2 gene polymorphisms with noise-induced hearing loss. // J. Thorac. Dis. 2016, 8 (3), 430–438.
2. Fortunato, G., Marciano, E., Zarrilli F. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. // Clin. Chem. 2004, 50 (11), 2012-2018.

## СХЕМА КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА БЕЗОПАСНОСТИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СРЕД

В.П. Калябина<sup>1,2</sup>, Е.Н. Есимбекова<sup>1,2</sup>, В.А. Кратасюк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия

E-mail: valeriyakalyabina@mail.ru

**Ключевые слова:** биолюминесцентный анализ, оценка безопасности сред, многокомпонентные среды, плодоовощная продукция, ферменты светящихся бактерий

Накопление загрязнителей различной природы в объектах окружающей среды и анализ степени их опасности являются одними из приоритетных задач экологической токсикологии. Сложные по составу среды, к которым относятся почва и плодоовощная продукция, способны в значительной степени аккумулировать потенциально токсичные вещества и в долгосрочной перспективе наносить вред здоровью человека [1]. Для контроля безопасности и минимизации рисков здоровью потребителей [2] необходимы методики комплексной оценки, позволяющие выявлять загрязняющие соединения в почвах и выращиваемой на них растительной продукции, а также адекватно оценивать потенциальные биологические эффекты на организм [3]. Биолюминесцентные методы токсикологического анализа на основе ферментативных систем, применяющиеся для оценки качества воды [4], могут быть потенциально использованы для обнаружения загрязнения гетерогенных по составу сред, к которым относится плодоовощная продукция.

**Цель работы** – разработка этапов конструирования экспресс-метода оценки безопасности плодоовощной продукции с помощью биолюминесцентных ферментативных систем.

**Материалы и методы.** В основе биолюминесцентного метода лежит обнаружение токсических свойств анализируемых веществ по их влиянию на функционирование ферментов светящихся бактерий [5]. На основе данных о высокой чувствительности к действию разных классов потенциально вредных соединений в данной работе была проверена возможность использования биферментной системы светящихся бактерий для оценки загрязнения сложных сред на примере плодоовощной продукции.

О степени воздействия анализируемых образцов на функционирование биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза (P) + люцифераза (Л) судили по остаточной интенсивности свечения, рассчитываемой по формуле:

$$I = \frac{I_0}{I_k} * 100\%$$

где  $I_0$  и  $I_k$  – средние значения интенсивности свечения в присутствии анализируемого и контрольного образца (дистиллированной воды) соответственно.

**Результаты.** Порядок конструирования ферментативных тестов для анализа безопасности сложных по составу сред представлял собой выделение рядов потенциальных загрязнителей и проверку чувствительности к ним ферментов, а затем оценку эффекта воздействия сред в отсутствие и в присутствии загрязнителей. Для определения чувствительности биферментной системы к основным потенциально опасным загрязнителям плодоовощной продукции в работе были проведены модельные эксперименты оценки ингибирующего воздействия ряда химических соединений на параметры биолюминесценции биферментной системы P+Л. Показана перспективность применения биферментной системы для обнаружения химического загрязнения плодоовощной продукции: ферментативная система светящихся бактерий является чувствительной к воздействию ряда тяжелых

металлов (свинец, цинк, медь, ртуть, алюминий, хром) и пестицидов ( $\alpha$ - и  $\gamma$ - изомеры гексахлорциклогексана, 4,4-дихлордифенилэтилен и 4,4-дихлордифенилтрихлорметилметан) на уровне и ниже их максимально допустимого содержания в плодоовощной продукции.

Далее в работе были выявлены особенности и ограничения при конструировании ферментативных тестов на основе биферментной системы Р+Л, связанные с индивидуальными характеристиками образцов, и предложены подходы для уменьшения различий в воздействии образцов. Так, выяснено, что добавление супернатантов различных образцов может приводить к существенным эффектам стимулирования или ингибирования биOLUMИнесцентной реакции, что необходимо учитывать для корректной интерпретации результатов ферментативного теста.

На заключительном этапе были установлены закономерности воздействия на биферментную систему Р+Л различных образцов овощных культур, искусственно загрязненных пестицидами и тяжелыми металлами для определения чувствительности ферментативной системы к токсикантам, находящимся непосредственно в образце. Результаты сравнивали с ранее полученными данными о воздействии рассматриваемых загрязняющих веществ на активность биферментной системы Р+Л, разведенных в дистиллированной воде (контрольные образцы). Так, было показано, что при внесении загрязнителей непосредственно в супернатанты плодоовощной продукции чувствительность биферментной системы Р+Л к их воздействию сохраняется на уровне ПДК для овощей, хотя и уступает чувствительности системы к металлам, разведённым дистиллированной водой.

**Заключение.** В данной работе обоснована целесообразность применения биOLUMИнесцентного метода для ферментативного тестирования сложных сред. Показана возможность разработки метода ферментативного анализа безопасности и оценки химического загрязнения плодоовощной продукции с помощью биферментной системы светящихся бактерий. Предложенные принципы конструирования ферментативных тестов в дальнейшем могут быть применимы для разработки биOLUMИнесцентного метода для оценки и контроля загрязнения других сложных по составу сред, например, почвы.

*Исследование выполнено за счёт средств гранта Российского научного фонда 16-44-242126.*

### **Литература**

1. Chang, C. Y. Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China / C. Y. Chang, H. Y. Yu, J. J. Chen [и др.] // Environ. Monit. Assess. – 2014. – № 186. – С. 1547–1560.
2. Exposure to highly hazardous pesticides: A major public health concern : The WHO recommended classification of pesticides by hazard // Всемирная организация здравоохранения. URL [http://www.who.int/ipcs/assessment/public\\_health/pesticides/en/](http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/pesticides/en/).
3. Xu, T. Detection of Organic Compounds with Whole-Cell Bioluminescent Bioassays / T. Xu, D. Close, A. Smartt, S. Ripp [и др.] // Biolum.: Fundam. Appl. in Biotech. Springer. 2014. Т. 144. С. 111-151.
4. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // Environ. Monit. Assess. – 2012. – Т. 185. – № 7. – С. 5905-5916.
5. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // Comb. Chem. High Through. Screen. – 2015. – Т. 18. – № 10. – С. 952–959.

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ОБЩЕЙ ФИЗИЧЕСКОЙ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНА

Т.Н. Евсеева<sup>1</sup>, А.М. Вышедко<sup>1</sup>, Л.И. Александрова<sup>1</sup>, Б.Б. Гомбоев<sup>1</sup>, Л.В. Степанова<sup>1</sup>,  
О.А. Коленчукова<sup>2</sup>, В. А. Кратасюк<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, 660022, Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН Обособленное подразделение Институт биофизики СО РАН, Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, Россия

E-mail: [evseeva.evseeva1997@yandex.ru](mailto:evseeva.evseeva1997@yandex.ru)

**Ключевые слова:** бактериальная ферментативная система NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, слюна, спортсмены, работоспособность

Проблема оценки физической работоспособности спортсмена достаточно хорошо проработана и исследована в спортивной медицине. К числу классических методов определения физической работоспособности относится разработанный в гарвардской лаборатории степ-тест. Данный тест характеризует способность организма работать на выносливость и выражает ее количественно через индекс. Провести правильный подбор режима теста при помощи таблиц и вычислений вручную не легко. При массовых исследованиях (команды, группы спортсменов) – практически мало выполнимая [1].

Альтернативой для диагностирования общей физической подготовленности спортсмена может являться тестирование биологического секрета спортсмена – слюны. Основой для конструирования биолюминесцентного метода анализа является биферментная система светящихся бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза [3]. В системе биосенсорных тестов такой интегральный тест необходим, так как он отражает состояние организма на молекулярном уровне, снимает проблемы с воспроизводимостью данных и больших ошибок измерения, свойственных биотестированию. Предварительные исследования показали успешность этого метода для выявления изменений в слюне как во время физических нагрузок, так и в период восстановления [2]. Поэтому целью настоящего исследования явилась оценка общей физической работоспособности спортсмена с помощью бактериальной биферментной биолюминесцентной тест-системы.

**Материалы и методы исследования.** В исследовании принимали участие спортсмены (n=51), профессионально занимающиеся вольной борьбой (n=11), спортивным ориентированием (n=14) и другими циклическими видами спорта (n=26). Испытуемые выполняли Гарвардский степ-тест в течение 5 минут с последующим измерением частот сердечных сокращений (ЧСС). Физическую работоспособность оценивали по индексу Гарвардский степ-теста (ИГСТ) [1].

Материалом исследования служила слюна спортсменов. Сбор слюны проводили до и после Гарвардского степ-теста. Перед тестированием слюну центрифугировали в течение 15 минут при частоте 5000 об/мин и использовали супернатант. Биолюминесцентное тестирование проводили на биферментной системе NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, входящий в комплект реактивов КРАБ (ИБФ СО РАН, Красноярск), который содержал лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов люциферазы EC 1.14.14.3 (0,4 мг/мл) из рекомбинантного штамма *E.coli* и NADH:FMN-оксидоредуктазы EC 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*) (0,18 ед. активности). Для центрифугирования слюны использовали центрифугу Eppendorf Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия). Биолюминесцентное свечение реакционной смеси регистрировали на планшетном



люминометре (TriStarLB 941, Германия). Реакцию биотеста на изменение биохимического состава слюны оценивали по величине остаточного свечения, вычисляемое как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения (слюна) и контрольного измерения (калий-фосфатный буфер).

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных разбросов (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub> процентиля). Корреляционную связь рассчитывали по критерию Спирмена. Уровень статистической значимости считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** По результатам тестирования Гарвадского степ-тест большинство спортсменов (40,3%) имели отличную физическую работоспособность с высоким показателем ИГСТ равным 101,0 [78,1; 83,3] баллов. Результаты биолюминесцентного тестирования слюны данных спортсменов показали, что изменение остаточного свечения биолюминесцентной тест-системы являлась величиной положительной и составляла 7,1 [-9,4; 18,1] %.

Остальные спортсмены одинаково разделились с хорошей (28,8%) и удовлетворительной (30,9%) физической работоспособностью, показатели ИГСТ которых отличались менее 10 баллов. Результаты биолюминесцентное тестирование слюны данных спортсменов отличались незначительно, величина изменение остаточного свечения являлись отрицательной.

Корреляционная зависимость между показателем ИГСТ и изменением остаточного свечения не выявлена ( $r=0,29$ ,  $p < 0,05$ ). Однако при разделении результатов спортсменов по группам, отличающиеся видом спорта, выявлена высокая положительная корреляционная связь ( $r=0,83$ ,  $p < 0,05$ ) для борцов; для спортсменов, занимающихся спортивным ориентированием, выявлена отрицательная корреляция ( $r=-0,47$ ,  $p < 0,05$ ); у спортсменов, занимающихся другими видами спорта, корреляционная связь отсутствовала ( $r=0,22$ ,  $p < 0,05$ ). Различие корреляционных зависимостей может быть обусловлено отличием физической нагрузки, получаемой организмом спортсменов. К примеру, борцы работают над силовыми упражнениями, ориентировщики выполняют кардио-нагрузку. Отсутствие корреляционной связи в группе спортсменов, занимающихся разными видами спорта, возможно, вызвано различной физической нагрузкой, получаемой во время тренировок.

Таким образом, показана возможность использования биолюминесцентного метода, построенного на основе биферментной системы светящихся бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, в качестве диагностического интегрального показателя для оценки работоспособности спортсмена на основе тестирования слюны. В дальнейшем биолюминесцентное тестирование слюны может быть перспективным направлением в спортивной медицине в качестве контроля тренировочного процесса с целью его коррекции.

*Исследование выполнено при поддержке Красноярского краевого фонда науки – проект «Разработка экспрессного интегрального метода оценки функционального состояния спортсмена с целью эффективного управления тренировочным процессом для достижения высокого спортивного результата».*

### **Литература**

1. Васильев, О. С. Компьютерный "степ-тест" – метод определения физической работоспособности / О. С. Васильев, Н. Г. Сучилин // Сборник научных трудов молодых ученых и студентов РГАФК. – Москва, 2000. – С. 156-157.
2. Степанова, Л. В. Использование биолюминесцентного тестирования слюны в оценке физической подготовленности спортсменов разной квалификации / Л. В. Степанова, А. М. Вышедко, О. А. Коленчукова, Г. В. Жукова, В. А. Кратасюк // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – №6. – С. 63-69.

3. Kratasyuk, V. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. Kratasyuk, E. Esimbekova // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. – 2015. – V. 18, Issue 10. – P. 952-959.

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КАК МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ В СПОРТИВНОМ КОНЕВОДСТВЕ

О.В. Колесник<sup>1</sup>, Л.В. Степанова<sup>1,2</sup>, А.С. Федотова<sup>3</sup>, О.А. Коленчукова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, д.79, 660041, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН Обособленное подразделение Институт биофизики СО РАН, Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, Россия

<sup>3</sup>Красноярский государственный аграрный университет, г. Красноярск, пр. Мира, 90, 660049, Россия

<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт медицинских проблем севера, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д.3Г, 660022, Россия

E-mail: [olga.kolesnik.krsk@gmail.com](mailto:olga.kolesnik.krsk@gmail.com)

**Ключевые слова:** бактериальная ферментативная система NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, слюна, спортивные лошади, физическая нагрузка

Основной движущей силой к повышению популярности отечественного конного спорта является его участие в международных конных соревнованиях. Разработка и внедрение интегральных методов скрининг-тестирования спортивных лошадей является значимым для спортивного коневодства. Совершенствование системы физической подготовки спортивных лошадей требует специальных методов для подготовки к соревнованиям, что возможно только при использовании объективных критериев оценки реакции организма на физическую нагрузку [1]. Экспрессное лабораторное скрининг-диагностирование можно проводить с использованием биосенсорной технологии – методом биолюминесцентного тестирования, основанного на изменении интенсивности свечения бактериальной ферментативной тест-системы [4] в ответ на добавление биологических секретов, например, слюны. В системе биосенсорных тестов такой интегральный тест необходим, так как он отражает состояние организма на молекулярном уровне, снимает проблемы с воспроизводимостью данных и больших ошибок измерения, свойственных биотестированию. Предварительные исследования показали успешность метода для выявления изменений в слюне спортсменов как во время физических нагрузок, так и в период восстановления [2].

**Цель исследования** – выявление возможности использования биолюминесцентного ферментативного тестирования слюны для определения физической нагрузки на организм лошадей.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 12 выездковых лошадях траккененской породы, которые содержались в учебно-спортивном комплексе коневодства КрасГАУ. Тестирование лошадей проводили до и после физических нагрузок с малой, средней и большой интенсивностью.

Материалом исследования служила слюна, которую перед тестированием центрифугировали в течение 15 мин при частоте 5000 об/мин и использовали супернатант.

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием бактериальной биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, входящая

в комплект реактивов КРАБ (Институт биофизики СО РАН, Красноярск). Для определения концентрации лактата в слюне использовали 0,4 М водный раствор хлорида железа (Компонент-Реактив, Россия).

Для центрифугирования слюны использовали центрифугу Eppendorf Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия). Билюминесцентное свечение реакционной смеси регистрировали на планшетном люминометре (TriStarLB 941, Германия). Калориметрирование слюны проводили на спектрофотометре Genesys 10S (Thermo Scientific, США). Частоту дыхательных движений определяли путем аускультации на фонендоскопе. Частоту сердечных сокращений измеряли на электрокардиографе ЭКЗТ – 01-"Р-Д".

В качестве интегрального показателя влияния физической нагрузки на изменение биохимического состава слюны использовали остаточное свечение, вычисляемое как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения (слюна) и контрольного измерения (калий-фосфатный буфер). Концентрацию лактата в образцах слюны определяли калориметрическим методом по реакции Берга.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Корреляционную связь оценивали по критерию Спирмена. Уровень статистической значимости считали достоверными при  $p < 0,01$ .

**Результаты и обсуждение.** Билюминесцентное свечение бактериальной биферментной тест-системы в присутствии слюны лошадей, взятых до физической нагрузки достоверно выше, чем после нагрузок ( $p \leq 0,01$ ). Увеличение интенсивности физической нагрузки усиливало ингибирование билюминесцентного свечения. При этом снижение величины остаточного свечения коррелировало с возрастанием частот дыхательных движений ( $r=0,6$ ,  $p < 0,01$ ) и сердечных сокращений ( $r=0,6$ ,  $p < 0,01$ ). Следовательно, физические нагрузки разной интенсивности воздействовали на организм спортивных лошадей, обуславливая изменение биохимического состава слюны, что вызывало ингибирование билюминесцентное свечение тест-системы.

Как известно, основным показателем тренированного организма является содержание лактата в организме, который при высоких физических нагрузках не изменяется у тренированного организма или уменьшается для начинающего спортсмена [3]. Выявленная неизменная концентрация лактата в слюне после физических нагрузок разной интенсивности свидетельствовала о хорошей тренированности лошадей. Изменение концентрации лактата в слюне коррелировало с изменением остаточного свечения ( $r=0,6$ ,  $p < 0,01$ ) при физической нагрузке малой интенсивности. С возрастанием интенсивности физической нагрузки корреляция между изменением концентрации лактата в слюне и изменением остаточного свечения не выявлено. Видимо, возрастание концентрации лактата в слюне, обусловленное физической нагрузкой малой интенсивности, способствует ингибированию билюминесцентной тест-системы. На снижение ингибирования билюминесцентного свечения при физических нагрузках средней и большой интенсивности, видимо, влияют другие показатели биохимического состава слюны, кроме содержания лактата, что необходимо выявить в дальнейших исследованиях.

Таким образом, показана возможность использования билюминесцентного метода, построенного на основе биферментной системы светящихся бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, в качестве диагностического интегрального показателя влияния физической нагрузки на организм на основе тестирования слюны. В дальнейшем билюминесцентное тестирование слюны может быть перспективным направлением в ветеринарии в качестве тест – контроля тренировочного процесса с целью его коррекции.

### Литература

1. Дайлиденко, В. Н. Спортивная работоспособность и адаптационные качества лошадей тракененской породы [Текст] / В. Н. Дайлиденко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2013. – №16 (2). – С. 126–133.
2. Степанова, Л. В. Использование билюминесцентного тестирования слюны в оценке физической подготовленности спортсменов разной квалификации / Л. В. Степанова, А. М. Вышедко, О. А. Коленчукова, Г. В. Жукова, В. А. Кратасюк // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – №6. – С. 63-69.
3. Karatosun, H. Blood and saliva lactate levels during recovery from supramaximal exercise / H. Karatosun, C. Cetin, et. al. // Saudi Medical Journal. – 2005. – Vol. 26, No 11. – P. 1831–1832.
4. Kratasyuk, V. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. Kratasyuk, E. Esimbekova // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2015. – V. 18, Issue 10. – P. 952–959.

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА БЕЗОПАСНОСТИ ПЛОДООВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ

К.В. Копылова<sup>1</sup>, В.П. Калябина<sup>1,2</sup>, Е.Н. Есимбекова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, Россия, 660041

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, Россия, 660036

E-mail: kseniya.kopylova@yandex.ru

**Ключевые слова:** билюминесцентный анализ, плодоовощная продукция, пробоподготовка образцов, пестициды, ферменты светящихся бактерий, оценка безопасности пищи

Для производства фруктов и овощей фермеры используют пестициды. В 2012 году количество израсходованных пестицидов при выращивании сельскохозяйственных культур составило 1,59 кг на 1 га пашни [1]. При употреблении продуктов, выращенных с использованием пестицидов, могут возникать головные боли, кожная сыпь, респираторные проблемы, судороги [2]. Поскольку современные методы анализа позволяют успешно определять следовые концентрации веществ, но не обеспечивают обнаружение всех загрязнителей, существует потребность в интегральном методе анализа, который бы позволял проводить комплексную оценку плодоовощной продукции. Ранее было показано, что билюминесцентный метод является перспективным для анализа безопасности плодоовощной продукции, однако для его применения необходимо провести предварительную корректировку методики пробоподготовки образцов.

**Цель работы** – оптимизация методики пробоподготовки образцов плодоовощной продукции для проведения билюминесцентного анализа их безопасности.

**Материалы и методы.** Билюминесцентная биферментная система – метаболическая реакция светящихся бактерий, катализируемая двумя ферментами (NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза (Р) и люцифераза (Л)), где одним из продуктов реакции является свет [3].

В основе билюминесцентного тестирования лежит детектирование загрязняющих веществ в анализируемых средах по их влиянию на протекание ферментативной реакции

светящихся бактерий. Остаточная интенсивность свечения биферментной системы рассчитывается по формуле:

$$I = \frac{I_0}{I_k} * 100\%,$$

где  $I_0$  и  $I_k$  – средние значения интенсивности свечения в присутствии анализируемого и контрольного образца (дистиллированной воды) соответственно.

Параметры пробоподготовки плодоовощной продукции были выбраны на основе предложенных ранее схем [4] и включали в себя механическое разрушение, центрифугирование и получение из образцов супернатанта, который в дальнейшем использовался в экспериментах.

**Результаты.** Проведен ряд экспериментов включающих измерение оптических характеристик растворов образцов в зависимости от степени их разведения. для уменьшения влияния на интенсивность свечения биферментной системы Р+Л органических компонентов анализируемого образца с помощью унификации оптической плотности. Показано, что в присутствии супернатантов образцов, разведенных в 4 и более раз, эффекты стимулирования и ингибирования были менее выражены (рисунок).

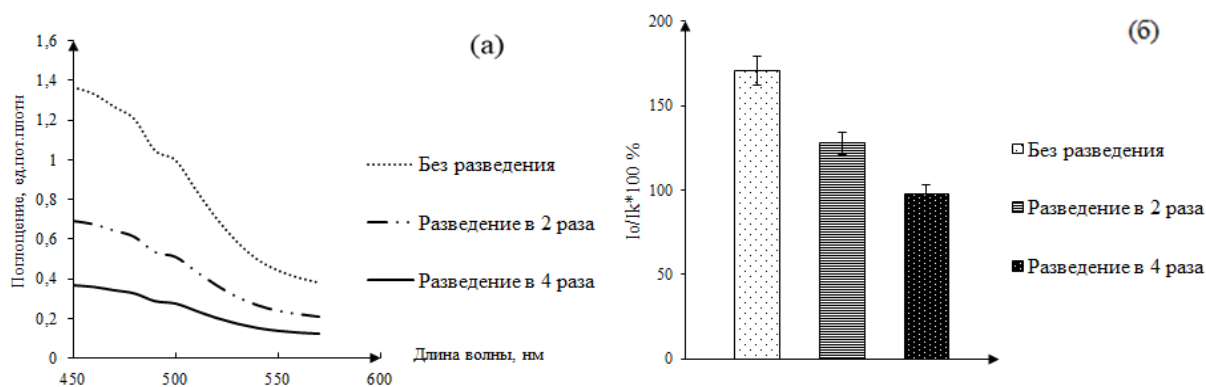


Рисунок – Оптическая плотность супернатанта образца тыквы (а) и остаточная интенсивность свечения биферментной системы Р+Л (б) в зависимости от различной степени разведения образцов

На примере образцов тыквы показано, что разведение супернатанта в 4 раза позволяет уменьшить стимулирование активности Р+Л системы и привести остаточную интенсивность свечения к контрольным значениям (рисунок). Также было оценено воздействие на параметры билюминесцентной системы таких индивидуальных характеристик образцов как вязкость, сахаристость, кислотность, обильная пигментация.

**Заключение.** Показано, что унификация образцов по оптической плотности в качестве дополнительного этапа их пробоподготовки позволяет уменьшить влияние индивидуальных характеристик различных сортов плодоовощной продукции на результаты измерений. Это дает возможность избежать ряда ограничений при использовании биферментной системы в качестве основы для ферментативного тестирования и позволяет считать билюминесцентный метод перспективным в качестве метода мониторинга безопасности пищевой продукции.

*Исследование выполнено за счёт средств гранта Российского научного фонда 16-44-242126.*

### Литература

1. Рынок пестицидов России и перспективы его развития / В.А. Захаренко // Защита и карантин растений. 2014. №11. с.3–6.

2. Risk assessment as a management tool used to assess the effect of pesticide use in an irrigation system, situated in a semi-desert region / A. M. Raschke, A. E. C. Burger // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 1997. №10 (1). с. 42–49.

3. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // Environ Monit Assess. 2012. № 185 (7). с.5905-5916.

4. Биолюминесцентный метод анализа качества сельскохозяйственных продуктов питания / В.П. Калябина, Е.Н. Есимбекова [и др.] // Материалы II-й Международной научной конференции «Биотехнология новых материалов – Окружающая среда – Качество жизни». – Красноярск: СФУ, 2017. с 156.

## ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ

В.И. Лоншакова-Мукина<sup>1</sup>, Е.Н. Есимбекова<sup>2,1</sup>, В.А. Кратасюк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет,

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

E-mail: viktoriya777-7@mail.ru

**Ключевые слова:** бутирилхолинэстераза, термоинактивация, крахмал, желатин, стабилизация ферментов.

Бутирилхолинэстераза (BuChE) играет ключевую роль в развитии и практике ингибиторного анализа, позволяя на широком круге материалов изучить вопросы субстрат-ингибиторной специфичности и влияния иммобилизации и условий измерения на аналитические характеристики определения ингибиторов [1]. Более того, BuChE является основой многих аналитических систем для контроля остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в сельском хозяйстве. Несмотря на это остаётся нерешённой проблема недостаточной стабильности BuChE при её использовании и хранении. Одним из основных способов получения стабильных ферментных препаратов BuChE является её иммобилизация в различные носители. Крахмал и желатин, полимеры природного происхождения, образующие вязкие растворы и способные к формированию геля, используются как для создания вязкого микроокружения ферментов, так и для их иммобилизации. , Целью настоящей работы является определение механизмов термической инактивации бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях для определения возможности использования данных полимеров в качестве стабилизаторов молекулы фермента.

Активность BuChE определяли по методу Элмана [2]. Регистрацию оптической плотности раствора проводили при длине волны 412 нм. По изменению оптической плотности во времени вычисляли скорость гидролиза субстрата S-бутирилтиохолина йодистого (S-BuChI) BuChE, по полученным результатам делали вывод об активности фермента. Определение оптической плотности образцов проводилось на спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония).

Установлено, что кинетика термоинактивации BuChE в крахмальном (3 %) и желатиновом (1,4 %) гелях имеет принципиально одинаковый характер на всем диапазоне исследуемых в работе температур (рисунок).

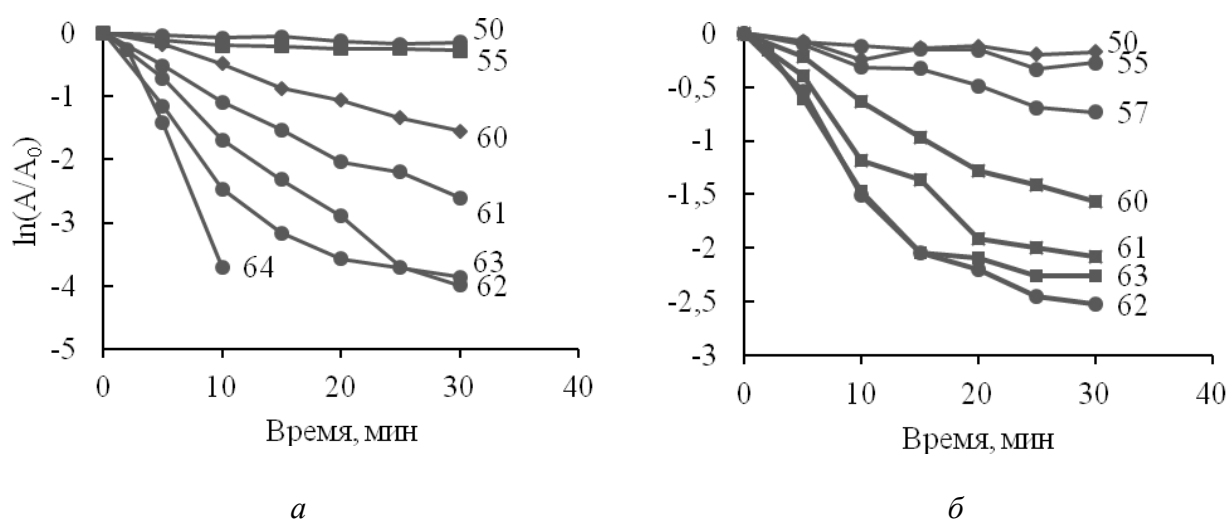


Рисунок 1 – Кинетические кривые термоинактивации BuChE при разных значениях температуры в присутствии 1,4 % желатина (а) и 3,0 % крахмала (б)

В температурном диапазоне от 50 до 64 °С наблюдается термоинактивация второго порядка, включающая два различных механизма инактивации BuChE, последовательно сменяющих друг друга и протекающих с разными скоростями.

Известно, что BuChE имеет четвертичную структуру представляющую собой гликопротеин, состоящий из четырех равных субъединиц [3]. Вероятно, первым процессом, происходящим при термоденатурации BuChE, является диссоциация фермента на субъединицы. Процессу диссоциации соответствует первый участок кинетических кривых термоинактивации. Затем, при увеличении времени воздействия повышенных температур на фермент, следует его необратимая денатурация, которой соответствует второй участок кинетических кривых термоинактивации BuChE.

Таким образом, в работе показано, что при температурах до 55 °С денатурации BuChE в гелях не наблюдается. При температурах от 57 до 64 °С термоинактивация имеет нелинейный характер. Установлено, что как крахмальный так и желатиновый гель оказывают стабилизирующий эффект при воздействии высоких температур на активность BuChE.

### Список литературы

1. Евтюгин Г.А. Проблемы аналитической химии. Отделение химии и наук о материалах РАН. Биохимические методы анализа. М.: Наука, 2010. Т. 12. 391 с.
2. Ellman G.L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone // Biochem. Pharmacol. – 1961. – V. 7. – P. 88-95.
3. Lee J.C. Physical properties and subunit structure of butyrylcholinesterase from horse serum / J.C. Lee, J.A. Harpst // Biochemistry. – 1973. – V. 12. – P. 1622-1630.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ *UREIBACILLUS* *THERMOSPHERAERICUS*, ПОЛУЧЕННОЙ ПУТЕМ КО-ЭКСПРЕССИИ С ШАПЕРОНАМИ

Ю.В. Самойлова<sup>1</sup>, К.Н. Сорокина<sup>1,2</sup>, А.В. Пилигаев<sup>1</sup>, В.Н. Пармон<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.5

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д.1

E-mail: samoylova.jv@catalysis.ru

**Ключевые слова:** эстераза, ко-экспрессия, шапероны, иммобилизация, CLEA

Термостабильные эстеразы в составе биокатализаторов применяют в различных биотехнологических процессах, включая синтез оптически чистых соединений для химической и фармакологической промышленности. Однако высокая стоимость ферментов сдерживает их широкое использование в промышленности. Разработка подходов к увеличению экспрессии ферментов в клетках продуцентов, а также оптимизация параметров их иммобилизации позволяют отчасти решить эту проблему.

**Цель** данной работы – исследование ко-экспрессии эстеразы estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* в присутствии молекулярных шаперонов и приготовление биокатализатора на ее основе методом CLEA.

**Материалы и методы.** Рекомбинантная эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* была получена ранее [1]. Ко-экспрессия эстеразы estUT1 с молекулярными шаперонами *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) и *Devosia psychrophila* (TF и ELS) была проведена в клетках *E. coli* BL21(DE3) путем индукции ИПТГ. Эстеразу выделяли в виде растворимой фракции белка с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии. На основе полученного белка была проведена оптимизация параметров приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 методом образования поперечно-сшитых агрегатов белка (CLEA) с помощью метода поверхности отклика (RSM). Активность estUT1 и CLEA-estUT1 определяли спектрофотометрически (OD<sub>405</sub> нм) с использованием эфиров карбоновых кислот *n*-нитрофенола в качестве субстратов [2].

**Результаты.** Ко-экспрессия эстеразы estUT1 с молекулярными шаперонами *D. psychrophila* и *E. coli* привела к увеличению экспрессии эстеразы в растворимой фракции, и активность для последнего составила  $200,7 \pm 15,5$  ЕА/мг белка. Для оптимизации условий иммобилизации полученного белка с помощью RSM была разработана модель, охватывающая следующие параметры: время иммобилизации, концентрации осаждающего агента, сшивающего агента и добавки. В соответствии с полученной моделью были определены оптимальные условия для приготовления CLEA-estUT1: время иммобилизации 5,1 ч, сульфат аммония 65,1% (вес./об.), глутаровый альдегид 120,6 мМ (вес./об.) и БСА 0,2 мМ (вес./об.). Удельная активность полученного биокатализатора CLEA-estUT1 составила  $29,4 \pm 0,5$  ЕА/мг биокатализатора. Исследование свойств биокатализатора CLEA-estUT1 показало, что иммобилизация методом CLEA повысила стабильность эстеразы estUT1 при pH 5-9 и температуре 50-80 °С. Также отмечена высокая стабильность иммобилизованной эстеразы по сравнению со свободной в присутствии различных химических веществ (PMSF, DDT, 2-меркаптоэтанол, SDS и Tween 20).

Таким образом, в работе удалось не только повысить экспрессию термостабильной рекомбинантной эстеразы estUT1, но и получить на ее основе биокатализатор,



отличающийся повышенной стабильностью в денатурирующих условиях, что позволит эффективно применять его в реакциях гидролиза сложных эфиров, в том числе в процессах разделения рацемических смесей.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-38-00386 мол\_а.*

#### **Литература**

1. Samoylova Y.V., Sorokina K.N., Romanenko M.V., Parmon V.N. Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII // *Extremophiles*. – 2018. – V. 22. – N 2. – P. 271-285.
2. Eom G. T., Song J. K., Ahn J. H., Seo Y. S., Rhee J. S. Enhancement of the Efficiency of Secretion of Heterologous Lipase in *Escherichia coli* by Directed Evolution of the ABC Transporter System // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – N 7. – P. 3468-3474.

## **ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛИ *MICRACTINIUM* SP. IC-76 И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДХОДА К ЕЁ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОПЕРЕЧНО-СШИТЫХ АГРЕГАТОВ ФЕРМЕНТА ЛИПАЗЫ БАКТЕРИИ *BURKHOLDERIA CERASIA***

**А.В. Пилигаев<sup>1</sup>, Ю.В. Самойлова<sup>1</sup>, К.Н. Сорокина<sup>1,2</sup>, В.Н. Пармон<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, 630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.5

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д.1

*E-mail: piligaev@catalysis.ru*

**Ключевые слова:** микроводоросли, липиды, липаза, ПСФА

Перспективным направлением для получения биодизельного топлива является применение биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов липаз, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными щелочными и кислотными катализаторами. Использование поперечно сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) рассматривается как один из наиболее перспективных способов иммобилизации липаз ввиду высокой производительности, стабильности и меньшей себестоимости в связи с отсутствием затрат на носитель. Тем не менее, переэтерификация липидов микроводорослей с использованием ПСФА остаётся ещё малоизученной. Получение биомассы оптимального состава с целью переработки в биодизельное топливо также является важным этапом к интенсификации производства биотоплива из микроводорослей.

**Цель работы** – получение липидов с максимальным содержанием триацилглицеридов из биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 и исследование реакции их ферментативной переэтерификации с использованием ПСФА на основе липазы бактерии *B. cerasia*.

**Материалы и методы.** Штамм микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 был выделен из образцов пресной воды Новосибирской области (Россия). Нарработку биомассы штамма микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 проводили в установке для культивирования объёмом 110 л. Динамику изменения состава продуцируемых липидов анализировали методом тонкослойной хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии. Приготовление биокатализатора на основе липазы бактерии *B. cerasia* проводили методом

образования поперечно сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве ко-фидера, и глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Реакцию биокаталитической переэтерификации липидов микроводорослей оптимизировали с применением метода отклика поверхности (RSM).

**Результаты.** При наработке партии биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в лабораторной установке выявлена фаза роста (17 сутки культивирования), при которой биомасса обладает максимальным содержанием триацилглицеридов с суммарным количеством насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот 44,1%. Удельная активность полученного в работе биокатализатора на основе липазы *B. ceracia* составила  $0,143 \pm 0,005$  ЕА/г. С использованием метода RSM установлены оптимальные условия получения МЭЖК в реакции переэтерификации: температура – 38,0 °С; количество биокатализатора – 9,1 %; концентрация воды – 2,5 %; соотношение метанол : липиды – 3,1;1. Максимальный выход МЭЖК в оптимальных условиях составил  $92,3 \pm 1,5\%$ .

**Заключение.** Определена оптимальная фаза роста штамма *Micractinium* sp. IC-76 для получения биомассы с максимальным содержанием нейтральных липидов. Экспериментально показана возможность использования нового подхода для получения биодизельного топлива из липидов микроводорослей с использованием экологически чистого биокатализатора на основе липазы бактерии *B. ceracia*.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-73-30032).*

## **РАЗДЕЛ 2.**

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ**



## NEW NANOSCALE POLYMER SYSTEMS AND THEIR INTERACTION WITH LIVING OBJECT

M.I. Shtilman<sup>1</sup>, A.N. Kuskov<sup>1</sup>, P.P. Kulikov<sup>1</sup>, A.L. Luss<sup>1</sup>, A.V. Goryachaya<sup>1</sup>, V.T. Jedzheya<sup>1</sup>,  
A.M. Tsatsakis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russian, Department of Biomaterials*

<sup>2</sup>*University of Crete, Medical School, Division Morphology, Greece*

*E-mail: shtilmanm@yandex.ru*

Micelles-like aggregates of amphiphilic polymers of N-vinylpyrrolidone are promising carriers of various biologically active, including medicinal, substances. To date, methods have been developed for the preparation of nanoparticles based on such polymers with immobilized poorly soluble or insoluble in water low molecular weight, biologically active compounds, such as indomethacin, diclofenac, amphotericin B, nystatin, 6-fluorouracil, rifabutin, felodipine, ionol, curcumin. The use of micellar-like aggregates of amphiphilic polymers of N-vinylpyrrolidone allows water-insoluble substances to be compatible with water, prolong their action, and reduce toxicity. Regulation of the release rate of the immobilized substance can be achieved by the creation of composite micelles based on such systems, including a core based on a hydrophobic biodegradable polymer, for example a polylactide.

On the other hand, aggregates of amphiphilic polymers of N-vinylpyrrolidone proved to be suitable for use as carriers of various proteins and peptides (blood factor IX, angiostatin, inhibitor of soybean proteinases). In this case, immobilization with the use of aggregates increases the resistance of proteins to denaturing effects, increases biological activity. Introduction of additional functional groups in the polymeric part of amphiphilic systems allows the use of aggregates as carriers of nucleic acids and their subsequent application for transfection in genetic engineering.

Using fluorescent labels and probes, it was shown that the immobilized substance introduced into larger aggregates penetrates into the living cell due to endocytosis, localizing in the cytoplasm inside the endosome. On the other hand, when immobilized matter is introduced in smaller aggregates, it evenly spreads both in the cytoplasm of the cell and in its nucleus.

## PRODUCTION OF NON-BIODEGRADABLE BIOPOLYMERS: CURRENT STATE AND PERSPECTIVES

A. Steinbüchel\*, C. Fndreessen

*Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität  
Münster, Corrensstraße 3, D-48149 Münster, Germany*

*\*E-mail: steinbu@uni-muenster.de*

**Keywords:** Polythioesters, non-biodegradable polymers, persistent biopolymers

The term 'bioplastic' is defined as either biodegradable plastic materials and/or plastics that are produced from renewable resources. Currently, bioplastics accounts to only about 1 % of the total plastic materials annually produced. Biodegradable polymers have attracted considerable interest by the chemical industry because they have applications in various areas like for example as compostable packaging materials or in medicine and pharmacy as resorbable materials. Polyhydroxyalkanoates (PHA) and polylactic acid (PLA) are fully biodegradable and are fully or partially synthesized by biotechnological processes, respectively.

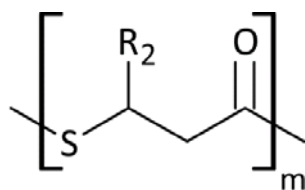


Figure – General formula of polythioesters (PTE)

On the other side, persistent polymers, which are not biodegradable, are of course also very important and essential for the manufacturing of long-living goods for example in automobiles and buildings. Biopolymers were ever considered to be biodegradable, and a large number of bacteria and fungi are able to grow at the expense of such polymers and to use them as carbon source for growth and energy. Against the paradigm that any compound, which is synthesized by the living matter, is biodegradable, it is possible to produce also persistent polymers completely or partially by biotechnological processes. Polythioester (PTE) homopolymers are only one example: they are fully persistent and completely synthesized in engineered bacteria expressing a synthetic pathway. Various PTEs can be so far produced from special organic sulphur compounds, which are obtained from the chemical industry, by fermentation of recombinant strains of *Escherichia coli* and other bacteria. Organic sulphur compounds are so far still required for biosynthesis of PTE. The composition of these PTE can be modified by engineering the metabolism of the strains or by using special feeding regimes or by a combination of both. Other examples for persistent ‘bioplastics’ are polyethylene and polypropylene, for which the building blocks can be synthesized by bacterial fermentation and then converted by chemical processes into intermediates that are chemically polymerized.

*The research was in part supported by the DFG.*

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ОПЫТНОГО ПРОИЗВОДСТВА РАЗРУШАЕМЫХ БИОПОЛИМЕРОВ (ПГА)

С.В. Прудникова<sup>1</sup>, А.В. Демиденко<sup>1,2</sup>, Е.Г. Киселев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

*E-mail: sprudnikova@sfu-kras.ru*

Микробиологический мониторинг и комплекс обязательных мероприятий необходимы для обеспечения надлежащего микробиологического статуса биотехнологического производства и отсутствия контаминации на всех стадиях технологического процесса. Инфицирование производственной культуры посторонней микрофлорой вызывает снижение качества получаемого продукта и производительности процесса вплоть до полного вытеснения штамма-производителя посторонней микрофлорой. Первичными источниками контаминации биотехнологических процессов являются потоки, входящие в ферментационные аппараты на стадии культивирования (инокулят, воздух, питательные среды); вторичными могут стать дискретные потоки воздуха производственных помещений, спецодежда персонала и т.п.

**Цель работы** – исследование микробиологического статуса опытного производства полигидроксиалканоатов (ПГА).

**Результаты.** Разработана и реализована схема микробиологического мониторинга и отбора проб в процессе исследования микробиологического статуса опытного производства,

включающая исследование помещения, производственного оборудования, потоков воздуха и компонентов питательной среды, качество получаемого продукта.

Результаты контроля подаваемого в ферментеры технологического воздуха представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Уровень контаминации воздушной среды помещений производственной зоны опытного производства

№ п/п	Место взятия проб	Численность бактерий, КОЕ/м <sup>3</sup>	Численность грибов, КОЕ/м <sup>3</sup>	ПДК, КОЕ/м <sup>3</sup>
1	Ферментационный зал	189 ± 63	не обнаружены	200
2	Отделение средоподготовки и стерилизации	142 ± 88	не обнаружены	
3	Блок дежурных операторов	142 ± 95	не обнаружены	
4	Отделение музейной культуры	47 ± 26	не обнаружены	
5	Блок обработки биомассы	95 ± 63	не обнаружены	

Анализ полученных данных показал, что полученные значения не превышали ПДК, предусмотренные для производственных помещений микробиологических производств. Среди микроорганизмов, присутствующих в воздушной среде, выделены бактерии, принадлежащие к 6 родам: *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* с преобладанием бактерии родов *Bacillus* и *Micrococcus* в количественном соотношении 36 и 28 %, соответственно, от общего числа бактерий. Остальные представители воздушной среды были в равном соотношении и составляли 9 % от общего числа микроорганизмов. Микогенной контаминации воздушной среды помещений производственной зоны не обнаружено. Показатели соответствуют значениям предельно допустимых концентраций [1, 2].

Результаты микробиологического контроля производственного помещения и аппаратуры представлена в табл. 2.

Таблица 2 – Микробиологический анализ производственных помещений после деконтаминирующих мероприятий

№ п/п	Место взятия проб	Численность бактерий, КОЕ/см <sup>2</sup>	Численность грибов, КОЕ/см <sup>2</sup>
1	Ферментационный зал	0,068 ± 0,011	не обнаружены
2	Отделение средоподготовки и стерилизации	0,064 ± 0,016	не обнаружены
3	Блок дежурных операторов	0,055 ± 0,028	не обнаружены
4	Отделение музейной культуры	0,015 ± 0,008	не обнаружены
5	Блок обработки биомассы	0,040 ± 0,024	не обнаружены

Результаты микробиологического анализа численности микроорганизмов показали, что она ниже предела допустимой микробной обсемененности. Это представители *Micrococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Acinetobacter* и 1 филум *Actinobacteria*, при этом преобладали бактерии родов *Bacillus* и *Micrococcus* в количественном соотношении 27 и 19 %, соответственно, от общего числа бактерий; бактерии рода *Sarcina* – 15 %, бактерии рода *Acinetobacter* – 12 %, бактерии рода *Propionibacterium* и *Corynebacterium* были в равном соотношении и составляли 10 % от

общего числа микроорганизмов, филум *Actinobacteria* составлял 7 %. Микромицетов в смывах исследуемых поверхностей не обнаружено.

С целью выяснения возможных источников заражения культуры анализировали питательные среды, которые использовали для приготовления инокулята, а также воду – конденсат после стерилизации ферментеров и воздух, поступающих в ферментационную линию во время технологического процесса. Во всех маточных растворах микро и макроэлементов живых микроорганизмов не обнаружено. Результаты микробиологического анализа блоков ферментационной линии, включая внутренние полости ферментеров, коммуникационные линии, а также воздуха, поступающего в технологический процесс, показали отсутствие живых микроорганизмов.

Результаты микробиологического анализа чистоты культуры в процессе ферментации представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Микробиологический анализ культуры продуцента *Cupriavidus eutrophus* B10646 в процессе ферментации

№ п/п	Место отбора проб	Период отбора проб	Наличие (посторонней микрофлоры)
1	Инокулят из колб	За 2-3 суток до засева в ферментер-инокулятор	Не обнаружены
2	Ферментер-инокулятор (V=30 л)	В течение 1 ч после засева в ферментер-инокулятор	Не обнаружены
3	Ферментер-инокулятор (V=30 л)	Через 10-20 ч после засева в ферментер-инокулятор	Не обнаружены
4	Производственный ферментер (V=150 л)	В течение 1 ч после засева в промышленный ферментер (V=150 л)	Не обнаружены
5	Производственный ферментер (V=150 л)	В конце культивирования на завершающей стадии микробиологического синтеза (40-60 ч)	Не обнаружены

Микробиологические исследования культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646, включая инокулят и производственную культуру, посторонней микрофлоры не обнаружили. Макрофотография однородности колоний и результаты микроскопирования культуры свидетельствуют об отсутствии контаминации (рисунок).

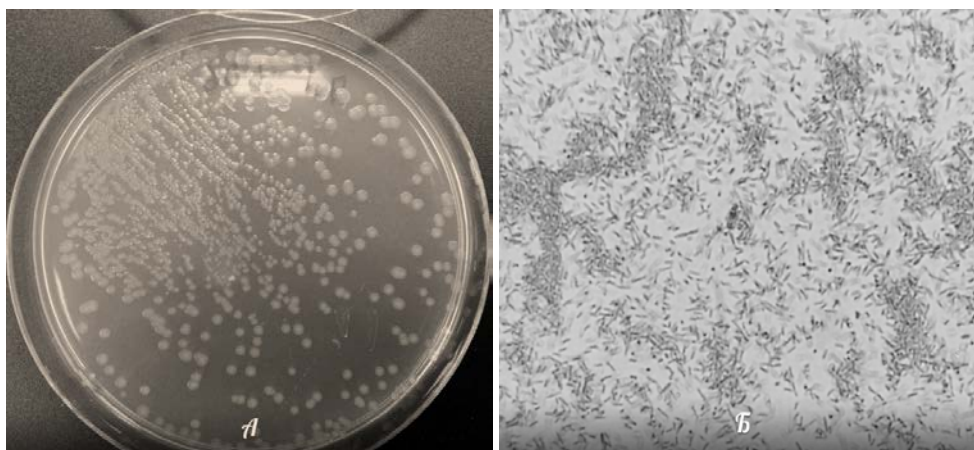


Рисунок – Микробиологическое исследование чистоты культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (А – макрофотография, Б – микроскопирование)



На постферментационной стадии проанализированы высушенная биомасса бактерий и полученный конечный продукт (полимер). Выявленные микроорганизмы являются типичной аэробной флорой, обнаруженной ранее в воздухе блока обработки биомассы. При исследовании лиофильно-высушенной биомассы *Cupriavidus eutrophus* В-10646 обнаружена микрофлора бактерий рода *Bacillus* и рода *Micrococcus* в количестве 3,7 %, что связано с контактом биомассы с воздушной средой помещений производственной зоны. Плесневых грибов, представителей группы кишечной палочки и сальмонелл не обнаружено.

**Заключение.** Принятый комплекс санитарно-гигиенических мероприятий обеспечил микробиологический статус опытного производства в соответствии с действующими требованиями международных и российских нормативных документов

### Литература

1. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. Дата введения 01.01.2010. Утвержден Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 мая 2009 г. № 159-ст.
2. Правила надлежащей производственной практики. Утверждены приказом Минпромторга России от 14 июня 2013 г. № 916. в ред. Приказа Минпромторга России от 18.12.2015 № 4148.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СИНТЕЗА СОПОЛИМЕРНЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ (ПГА) НА ГЛИЦЕРИНЕ

А.В. Демиденко<sup>1,2</sup>, Н.О. Жила<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79,

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: kraysolnca@mail.ru

Наиболее ценными продуцентами полигидроксиалканоатов (ПГА) являются штаммы, способные синтезировать, помимо высококристаллического поли(3-гидроксибутирата [П(ЗГБ)]), сополимеры, содержащие мономеры, отличные от ЗГБ. Включение различных мономеров в цепь ЗГБ зависит от физиолого-биохимической специфики штаммов, субстратной специфичности ПГА-синтазы, устойчивости клеток к ингибирующему воздействию субстратов-предшественников искомым мономеров, условий аккумуляции ПГА на смешанном углеродном субстрате.

**Цель исследований:** изучение способности бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 синтезировать сополимерные ПГА при использовании в качестве основного субстрата глицерина.

**Материалы и методы.** Бактерии выращивали в периодическом режиме с использованием термостатируемых шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova® серии 44» «New Brunswick Scientific» (США), позволяющих вести процесс в колбах объемом от 0,5 до 3,0 л. Для выращивания бактерий за основу принята сбалансированная солевая среда Шлегеля с заменой глюкозы на очищенный глицерин в качестве основного источника углерода, исходная концентрация которого в среде составляла 20 г/л. Для синтеза сополимеров в среду дополнительно вносили валерат калия, пропионат калия и ε-капролактон (предшественники синтеза мономеров 3-гидроксиалканоата и 4-гидроксибутирата), добавки вносили в культуру в период наиболее активного синтеза полимеров (10–12 ч от начала культивирования) в концентрации 0,5–1,0 г/л.

**Результаты.** На рисунке представлены результаты исследования роста и синтеза ПГА бактериями *C. glutamicum* В-10646 на среде с глицерином с добавками валерата калия и  $\epsilon$ -капролактона.

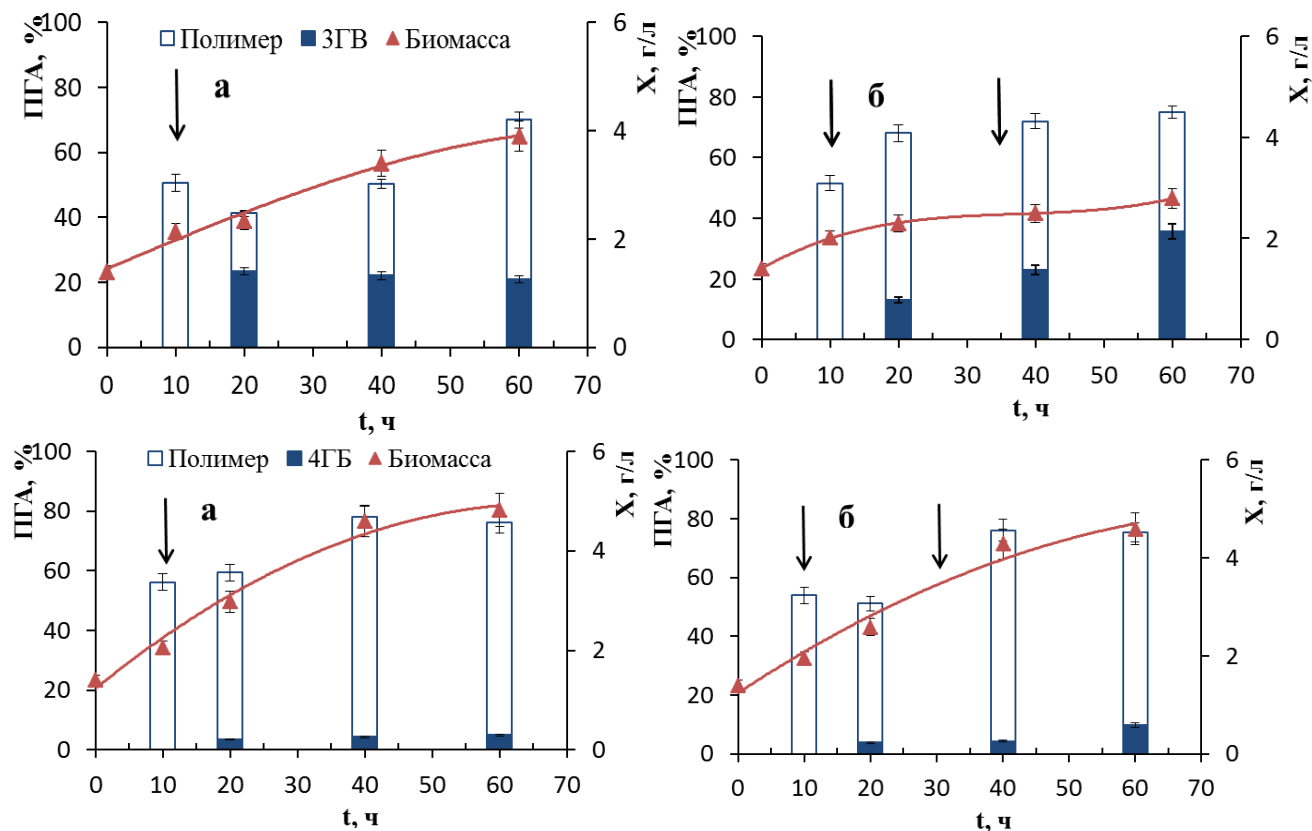


Рисунок – Синтез сополимерных ПГА *C. glutamicum* В-10646 на глицерине с добавками в культуру валерата калия и  $\epsilon$ -капролактона (а – одна добавка; б – две добавки; обозначено стрелками)

Варьирование количества добавок валерата калия, пропионата калия или  $\epsilon$ -капролактона позволило синтезировать серию сополимерных ПГА различного состава. Наиболее высокие показатели по включению мономеров 3ГВ и 4ГВ в полимер получены при двух добавках субстратов предшественников. Так, при двух добавках валерата калия, содержание сополимера П(3ГВ/3ГВ) за 60 ч составило  $70,0 \pm 4,0\%$ , включение мономеров 3ГВ достигло  $35,7 \pm 2,0$  мол.%, однако на фоне снижения урожая биомассы до  $3,0 \pm 0,3$  г/л в результате ингибирующего действия валерата калия. При двух добавках пропионата калия содержание полимера было выше ( $81,3 \pm 5,7\%$ ), включение мономеров 3ГВ близким (на уровне  $28,5 \pm 2,0$  мол.%). Вследствие меньшего токсического эффекта пропионата калия для бактерий урожай биомассы составил  $3,48$  г/л, что несколько выше, чем при использовании валерата калия. При двух добавках в культуру бактерий  $\epsilon$ -капролактона получен другой тип сополимеров П(3ГВ/4ГВ) с содержанием мономеров 4ГВ в нем  $9,8 \pm 0,6$  мол.% при урожае биомассы  $4,5 \pm 0,3$  г/л. Хотя  $\epsilon$ -капролактон и оказывает ингибирующее воздействие на культуру, но это воздействие менее выражено, чем при использовании прекурсоров для синтеза мономеров 3ГВ.

**Заключение.** Таким образом, на глицерине в качестве основного С-субстрата в культуре *C. glutamicum* В-10646 и добавках субстратов предшественников реализован синтез не только гомополимера П(3ГВ), но и более технологичных сополимерных ПГА с различным набором и соотношением мономеров при некотором снижении продукционных показателей культуры.

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

## **ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ ГЛИЦЕРИНА – ОТХОДА ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЯ, НА ПРОДУКЦИЮ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА В КУЛЬТУРЕ *S. EUTROPHUS* В-10646**

**А. В. Демиденко<sup>1,2</sup>, С. В. Барановский<sup>1</sup>, Е.Г. Киселев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79,*

<sup>2</sup>*Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50*

*E-mail: evgeniygek@gmail.com*

Расширение объемов производства и областей применения разрушаемых полигидроксиалканоатов (ПГА) лимитировано их стоимостью. Среди перспективных субстратов для крупнотоннажного производства ПГА рассматривают глицерин, масштабы производства которого возрастают в связи с ростом производства биодизеля как альтернативного нефти возобновляемого источника энергии. Согласно оценке аналитиков Oil World по итогам 2016 г., мировое производство биодизеля достигло рекордных 33 млн тонн; 10% от этих объемов составляет глицерин как побочный продукт. Достигнутые за рубежом в лабораторных условиях уровни продуктивности по урожаю биомассы бактерий и выходу полимеров значительно варьируют, что связано с наличием в глицерине примесей, негативно влияющих на молекулярную массу полимеров и общие выходы [1]. В целом, анализ публикаций свидетельствует о несомненной перспективности глицерина в качестве субстрата для получения ПГА. Однако для улучшения производственных показателей производства ПГА на глицерине необходимо привлечение новых штаммов и совершенствование технологических стадий процесса, в том числе в масштабированных вариантах.

**Цель работы** – исследование эффективности синтеза ПГА при использовании глицерина различной очистки.

**Материалы и методы.** Использовали глицерин дизельного производства различной степени очистки: очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция): содержание глицерина 99,3; хлориды 0,0001; соли (NH<sub>4</sub>) – 0,005; Fe – 0,00005; As – 0,00004; влажность – 0,09; жирные кислоты и эфиры – 0,025 (% масс.); тяжелые металлы до 0,00005 (% масс.); глицерин-II В.V («Duth glycerol refinery», Нидерланды): содержание глицерина 99,7; хлориды <0,001; влажность 0,09; жирные кислоты и эфиры 0,21; сульфаты <0,002; общие органические примеси 0,5-1,0; индивидуальные органические примеси 0,1 (% масс.); тяжелые металлы <5 (мкг/г); сырой глицерин-III («M.V.R. PINAConsultoria Tecnica», Бразилия): содержание глицерина 82,07; хлориды 4,35; метанол 0,13; зола 6,59; влажность 9,88 (% масс.); рН 5,8. Для синтеза сополимерных ПГА, содержащих, помимо мономеров 3-гидроксибутирата (ЗГБ), мономеры 3-гидроксивалерата (ЗГВ) или 4-гидроксибутирата (4ГБ) в состав среды в качестве субстратов предшественников этих мономеров вносили, соответственно, валерат или пропионат калия или ε-капролактон («Acros Organics», США)

Для культивирования бактерий использовали ферментер фирмы Bioengineering NLF 22 (Швейцария) с объемом аппарата 30 л с коэффициентом заполнения 0,7. Использовали режим, обеспечивающий высокие выходы полимера, разработанный нами ранее [2].

**Результаты** оценки продукционных показателей культуры *S.eutrophus* В-10646 на глицерине различной степени очистки по урожаю биомассы клеток и выходу полимера оказались близкими. Независимо от степени очистки глицерина, урожаем общей биомассы составил за 60 ч около 70 г/л, содержание полимера в клетках 72-73% (таблица).

Таблица – Продукционные показатели биосинтеза ПГА в культуре *S.eutrophus* В-10646 на глицерине различной очистки

Глицерин	X, г/л	ПГА, %	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	Y <sub>x</sub> г/г	Y <sub>п</sub> г/г	Продуктивность (P), г/л*ч	
						P <sub>x</sub>	P <sub>p</sub>
Глицерин-I	69,3±3,5	72,1±3,6	0,101	0,38	0,29	1,10	0,81
Глицерин-II	69,8±3,5	73,3±3,6	0,097	0,39	0,29	1,15	0,90
Глицерин-III	69,3±2,9	73,3±3,2	0,100	0,36	0,29	1,15	0,89

На рисунке в качестве примера приведены результаты культивирования бактерий *S.eutrophus* В-10646 на сыром глицерине. Наиболее высокие значения удельной скорости роста бактерий (по общей и по активной биомассе) имели место в начальный период первого этапа процесса, составив, соответственно, 0,14±0,01 ч<sup>-1</sup> и 0,13±0,01 ч<sup>-1</sup>. Этому периоду соответствовало наиболее активное потребление глицерина культурой, в среднем на уровне 4,2±0,2 г/г·ч.

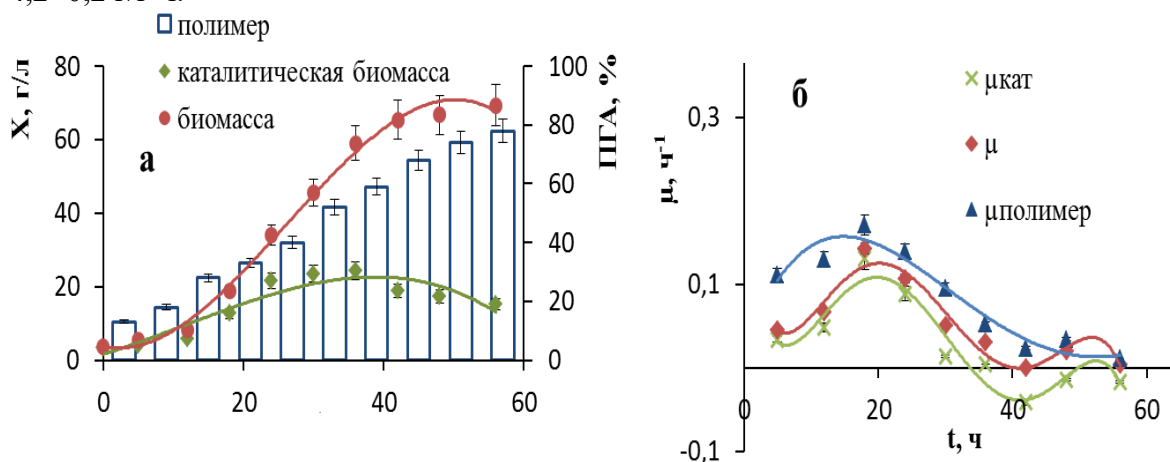


Рисунок – Показатели культуры *S. eutrophus* В-10646 при выращивании в 30-л ферментере культурой на сыром глицерине: а – концентрация общей и каталитически активной биомассы клеток в культуре (г/л) и полимера в клетках (% к АСБ); б – динамика удельной скорости прироста общей ( $\mu$ , ч<sup>-1</sup>) и каталитически активной ( $\mu_{кат}$ , ч<sup>-1</sup>) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ( $\mu_{полимер}$ , ч<sup>-1</sup>)

Средняя скорость синтеза полимера на этом этапе составила 0,17±0,02 ч<sup>-1</sup>. В конце первого этапа процесса при росте бактерий с лимитированием по азоту спустя 30 ч общая концентрация биомассы клеток составила 46,2±2,7 г/л, содержание полимера в клетках – 52,2±2,1%. С 31-го часа начался второй этап, при котором подача азота в культуру была прекращена; контролируемая подача глицерина и минеральных элементов исключала возникновение дефицита этих субстратов в культуре. На втором этапе имели место постепенное снижение удельных скоростей роста бактерий и синтеза полимера на фоне падения потребления глицерина. В конце ферментационного периода (60 ч) общий урожай биомассы клеток составил 69,3±2,9 г/л, выход полимера – 73,3±3,2 %. Расход глицерина сырья за весь период составил 3,8±0,2 кг, что соответствует экономическому коэффициенту по полимеру Y<sub>п</sub>=0,26±0,02. Учитывая, что в неочищенном (сыром) глицерине его концентрация составляет 82,07 %, то экономический коэффициент в пересчёте на

абсолютный глицерин сопоставим со значениями, полученными на очищенном глицерине ( $Y_n=0,29\pm 0,02$  г/г).

**Заключение.** Показано, что производственные характеристики *C.eutrophus* B-10646 при использовании глицерина различной очистки сопоставимы; применение сырого глицерина не ингибировало рост бактерий и синтез ПГА.

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

#### Литература

1. Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M.M., Braunnegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* 37, 24–38.
2. Volova, T.G., Kiselev, E.G., Vinogradova, O.N., Nikolaeva, E.D., Chistyakov, A.A., Sukovaty, A.G., Shishatskaya, E.I., 2014. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. *PloS One.* 9, e87551.

## МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА ПГА НА ГЛИЦЕРИНЕ В УСЛОВИЯХ ОПЫТНОГО ПРОИЗВОДСТВА

А.В. Демиденко<sup>1,2</sup>, С.В. Барановский<sup>1</sup>, Е.Г. Киселев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79,

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: [evgeniygek@gmail.com](mailto:evgeniygek@gmail.com)

Анализ результатов исследования синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки показал пригодность для не ингибированного роста и эффективного синтеза полимеров бактериями *C.eutrophus* B-10646, независимо от степени очистки и содержания в нем примесей. Для масштабирования технологии выбран вариант процесса, реализуемый на глицерине марки «Duth glycerol refinery» (Нидерланды). Разработанные Исходные данные использованы для масштабирования технологии производства полимеров в условиях опытного производства. Технология включает три биотехнологические стадии: предферментационную (подготовка и стерилизация оборудования, получение инокулята и питательных сред), стадию ферментации (реализация процесса в производственном ферментере и наращивание биомассы клеток с максимальными выходами полимера) и постферментационную стадию (получение готового продукта и работа с побочными продуктами и отходами).

Полученный на предферментационной стадии инокулят по стерильной посевной линии перекачивали в производственный ферментёр объемом 150 л при стартовой концентрации клеток в культуре порядка  $10,0\pm 5,0$  г/л. В производственном ферментере на первой стадии бактерии выращивают в режиме с лимитирующей концентрацией азота (основной фактор, стимулирующий внутриклеточную аккумуляции П(ЗГБ) (50% от физиологической потребности клеток), регулируя входной поток в ферментер раствора мочевины насосом дозатором при стабилизации остаточной концентрации азота в культуре на уровне 0,5-0,7 г/л. Все остальные компоненты среды, включая источник углерода (глицерин), макро- и микроэлементы поступают в ферментер в избытке регулируемой отдельной подачей соответствующих субстратов насосами дозаторами. Показатели параметров технологического процесса (динамика потребления азота и глицерина культурой, расход воздуха, обороты мешалки, активная реакция среды) представлены на рисунке. На

первой стадии процесса, в первые 25 ч на фоне активного роста бактерий имело место наиболее активное потребление субстратов культурой. Скорость потребления глицерина ( $q_s$ ) на 15 ч процесса достигала максимума ( $3,8 \pm 0,3$  г/г·ч) и далее постепенно снижалась по мере увеличения общей биомассы бактерий в культуре до  $3,1 \pm 0,2$  г/г·ч. К концу первой стадии процесса (23–25 ч) концентрация биомассы составила  $78,8 \pm 3,9$  г/л, внутриклеточное содержание полимера  $45,0 \pm 2,2$  %. Скорость потребления мочевины культурой ( $q_{\text{карб}}$ ) также возрастала на первом этапе, достигает максимума на 10–15 ч ( $0,61 \pm 0,05$  г/г·ч). Концентрацию растворённого кислорода поддерживали на уровне 2,4–3,0 мг/л ( $D(O)$  30 %). Максимальный расход воздуха зафиксирован к концу первой стадии процесса (15–20 ч) и составил 200 нл/ч.

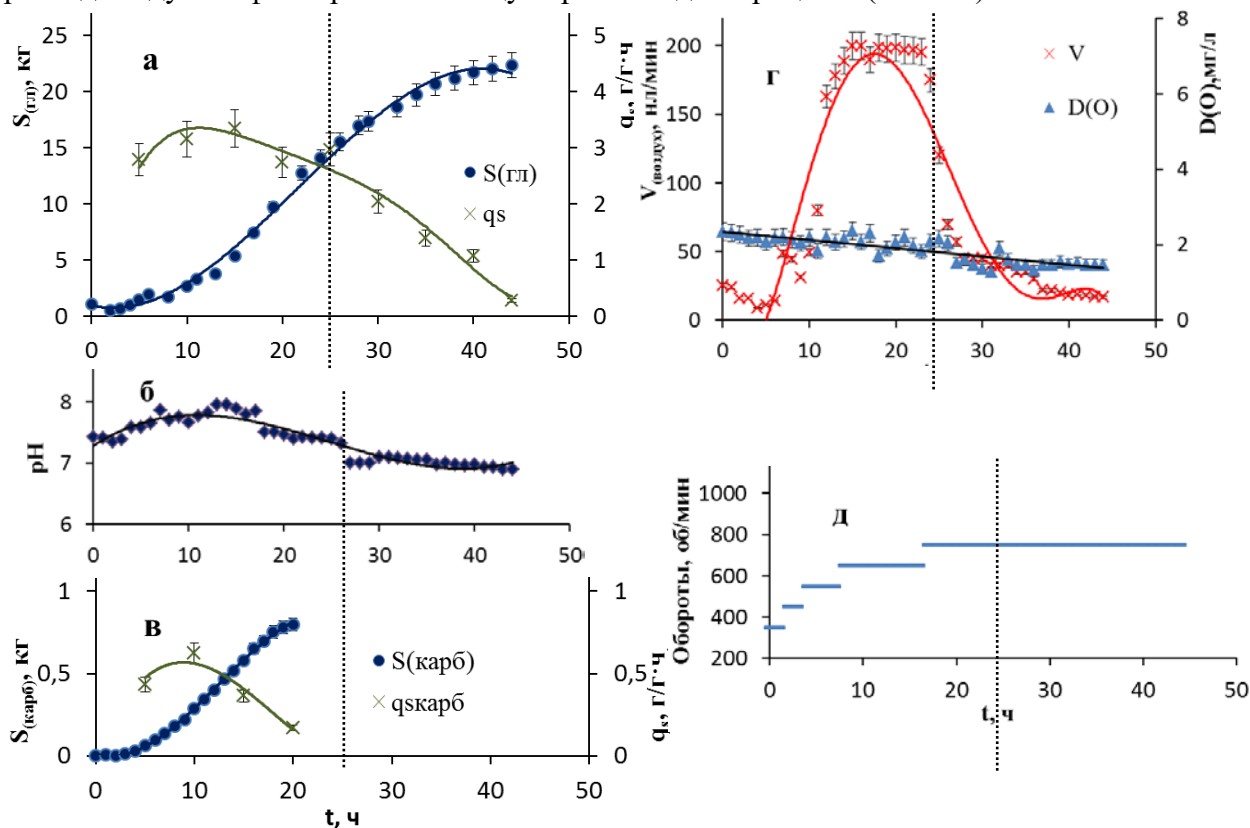


Рисунок – Технологические параметры процесса синтеза ПГА в культуре *S.eutrophus* B-10646 в производственном ферментере ОП на глицерине: а – потребление глицерина культурой *S.eutrophus* B-10646 ( $S$ ) и скорость потребления культурой глицерина ( $q_s$ ); б – изменение pH в процессе; в – потребление карбамида ( $S_{\text{карб}}$ ) и скорость потребления карбамида ( $q_{\text{карб}}$ ); г – расход воздуха ( $V$ ) и поддерживаемая концентрация растворённого кислорода ( $D(O)$ ); д – обороты мешалки

Максимальные значения удельной скорости роста бактерий (по общей и каталитически активной биомассе) имели место в начальный период первой стадии процесса на полной питательной среде с лимитированной подачей азота, составив, соответственно,  $0,17 \pm 0,01$  ч<sup>-1</sup> и  $0,16 \pm 0,01$  ч<sup>-1</sup> при удельной скорости синтеза П(ЗГБ) на уровне  $0,20 \pm 0,02$  ч<sup>-1</sup>. На втором этапе процесс продолжали в безазотной среде. Наблюдаемый прирост общей биомассы происходил в основном в результате накопления в клетках полимера, так как собственно рост клеток имел тенденцию к снижению, а значения удельной скорости роста (по каталитически активной биомассе) приобретали отрицательные значения. На фоне возрастания общей биомассы клеток и снижения каталитически активной биомассы за счет увеличения внутриклеточной концентрации полимера, физиологическая активность культуры постепенно снижалась. Удельная скорость роста по общей биомассе к концу второй стадии составили  $0,013 \pm 0,001$  ч<sup>-1</sup>; по каталитически активной биомассе снижалась до

нуля, а к концу процесса принимала отрицательные значения. Удельная скорость синтеза полимера к началу второй стадии была на уровне  $0,070 \pm 0,004 \text{ ч}^{-1}$  с последующим снижением. На этом фоне происходило снижение потребления основных субстратов; – глицерина на порядок, с  $3,1 \pm 0,2$  до  $0,3 \pm 0,1 \text{ г/г}\cdot\text{ч}$ .

При завершении процесса объём культуры составил 90 л; урожай общей (валовой) биомасса ( $X$ , г/л)  $110 \pm 5,5$  г/л; внутриклеточное содержание полимера  $76,1 \pm 2,3$  %. Полученные значения продуктивности процесса, достигнутые в условиях опытного производства, составили по общей (валовой) биомассе  $2,29 \pm 0,07 \text{ г/л}\cdot\text{ч}$ ; по полимеру –  $1,83 \pm 0,06 \text{ г/л}\cdot\text{ч}$ . Эти показатели превышают ранее полученные на глюкозе в аналогичных условиях культивирования данного штамма бактерий в условиях опытного производства (Киселев с соавт., 2014).

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

#### **Литература**

Киселев Е.Г., Демиденко А.В., Барановский С.В., Волова Т.Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – Т. 7, №2. – С. 134-147

## **СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ (ПГА), СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ГЛИЦЕРИНЕ**

**А.В. Демиденко<sup>1,2</sup>, Н.О. Жила<sup>1,2</sup>, Е.Г. Киселев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79,*

<sup>2</sup>*Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50*

*E-mail: kraysolnca@mail.ru*

Углеродное питание оказывает влияние не только на продукционные показатели процессов микробиологического роста, но также на состав получаемых продуктов. В связи с участием глицерина в реакциях полимеризации мономеров в С-цепи и блокировании этого процесса возможно снижение общего выхода и молекулярной массы полимеров. Поэтому важное значение приобретает исследование физико-химических свойств полимеров, синтезируемых на глицерине.

**Цель** – исследование свойств ПГА, синтезированных на глицерине различной очистки.

**Материалы и методы.** Внутриклеточное содержание и состав ПГА определяли на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890А с масс детектором Agilent Technologies 5975С («Agilent», США) и по снятым <sup>1</sup>Н-ЯМР спектрам растворов образцов полимеров в CDCl<sub>3</sub> с использованием ЯМР-спектрометра Advance III 600 («Bruker», Германия). Молекулярно-массовые характеристики полимеров (среднечисловую и средневесовую молекулярную массу ( $M_n$  и  $M_w$ ), полидисперность) определяли с использованием системы гель-проникающей хроматографии «Agilent 1200» Infinity (Германия) с набором полистироловых стандартов («Sigma»); степень кристалличности – с применением рентгеноструктурного анализа D8 Advance («Bruker», Германия), температурные характеристики – на основе дифференциального термического анализа DSC-1 Mettler Toledo (Швейцария).

**Результаты.** Образцы ПГА, синтезированные на исследованных марках глицерина, независимо от содержания основного вещества и примесей, представляли собой гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты – П(ЗГБ). При этом не выявлено разницы во влиянии на свойства полимера типа глицерина, а также драматических изменений по сравнению с глюкозой (таблица).

Полимер, синтезируемый адаптированной к глицерину продуктивной культурой *S. eutrophus* В-10646 на всех типах глицерина имел по сравнению с образцами, полученными на глюкозе, сниженные значения среднечисловой и средневесовой молекулярной массы; более выраженное на сыром глицерине, когда значения  $M_n$  и  $M_w$  составили 87 и 304 кДа; несколько выше – на очищенном глицерине:  $M_n$  104-115 кДа;  $M_w$  355-420 кДа при полидисперсности (D) 3,42 и 3,63. Все значения молекулярной массы П(ЗГБ), синтезированного на глицерине, в целом ниже, чем получаемые ранее значения для образцов П(ЗГБ), синтезированных на других субстратах.

Таблица – Физико-химические свойства образцов П(ЗГБ), синтезированных на глицерине различной очистки

Субстрат	$M_n$ , кДа	$M_w$ , кДа	D	$C_x$ , %	$T_g$ , °C	$T_c$ , °C	$T_{melt}$ , °C	$T_{degr}$ , °C
Глюкоза	365	920	2,52	76	-	92	178	295
Глицерин-I	104	355	3,42	50	2,9	96	174	296
Глицерин-II	115	416	3,63	55	-	103	176	296
Глицерин-III	87	304	3,49	52	2,7	99	172	295

«-» – пик отсутствует

В связи с тем, что глицерин действует как агент переноса цепи в полимеризации ПГА, что связано с этерификацией глицерина на концевых группах мономеров и блокированию дальнейшего процесса полимеризации С-цепи, проанализирована структура образцов полимера с применением ЯМР. Полные спектры  $^1H$ -ЯМР трех образцов П(ЗГБ), синтезированных на трех марках глицерина, оказались сходными и показали наличие резонансов, метиловых групп в области 1,25 ppm; метиленовой группы между 2,45 and 2,65 ppm, и метиновая группа – 5,25 ppm. Расширение спектральной области между 3,0 и 4,5 м.д. (рис. 1) выявило наличие дополнительных резонансов, соответствующих терминальным группам глицерина. Глицерин состоит из 2 первичных и 1 вторичной гидроксильных групп, поэтому существует вероятность того, что присоединение глицерина к мономерам ЗГБ в цепи П(ЗГБ) также может быть результатом ковалентного связывания во вторичной гидроксильной группе глицерина. Расширенная область с тремя резонансами 3,7 м.д., 3,95 м.д. и 4,18 м.д. показала терминальную этерификацию глицерина в П(ЗГБ) через первичные гидроксилы (положения  $C_1$  или  $C_3$  глицерина). Резонанс при 3,86 м.д. показал концевое присоединение глицерина к П(ЗГБ) через вторичную гидроксильную группу.

ПГА относятся к полукристаллическим полимерам, у которых соотношение аморфной и кристаллической фаз варьирует в зависимости от химического состава и набора и соотношения мономеров. Все три образца П(ЗГБ) имели близкие значения степени кристалличности (50-55%) (рис. 2). Это не характерно для высококристаллического П(ЗГБ), у которого упорядоченная фаза преобладает над неупорядоченной, и степень кристалличности ( $C_x$ ) составляет от 65 до 80%. Отбор и анализ образцов полимера, синтезированного *S. eutrophus* В-10646 в разные фазы роста культуры на глицерине, показал, что, независимо от возраста культуры, то есть от скорости синтеза полимера и его внутриклеточного пула,  $C_x$  не



превышает 50-55%. Таким образом, на глицерине синтезируются образцы полимеров, в которых имеет место выравнивание аморфной и кристаллической фаз в объеме полимера.

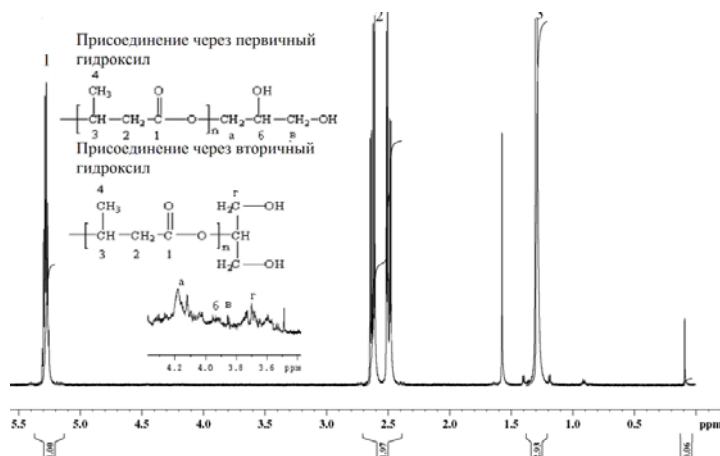


Рисунок 1 – <sup>1</sup>H-ЯМР спектр П(ЗГБ), синтезированного *S. eutrophus* В10646 на глицерине: 1 – СН группа, 2 – СН<sub>2</sub> группа, 3 – СН<sub>3</sub> группа; расширенная спектральная область между 3,0 и 4,5 м.д.

Отклонений в показателях температурных характеристик у исследованных образцов П(ЗГБ) не обнаружено. Температуры плавления ( $T_{пл}$  160-180 °С); деградации ( $T_{дегр}$  260-290 °С) находились в ранее выявленных пределах значений с сохранением разрыва между ними порядка 100 °С, что соответствует значениям П(ЗГБ), полученным на других С-субстратах (СО<sub>2</sub> и сахарах) (рис. 2).

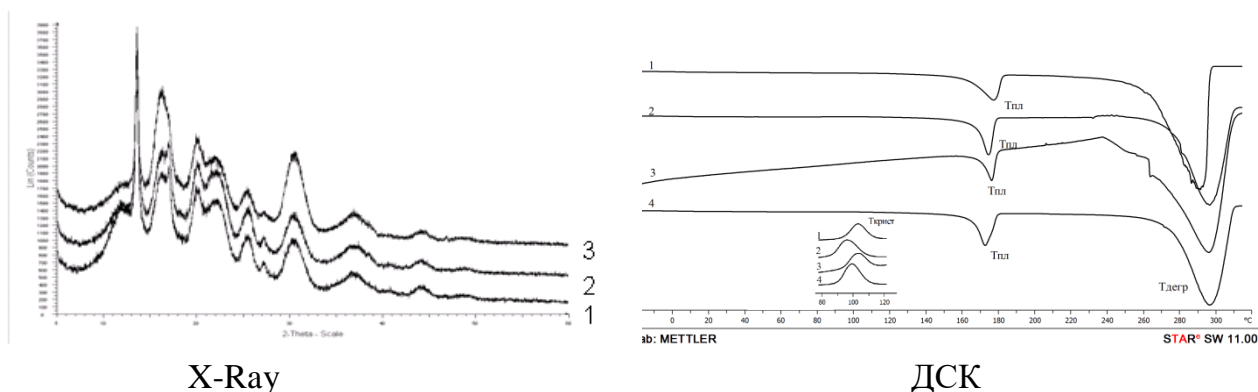


Рисунок 2 – Рентгенограммы и кривые ДСК образцов П(ЗГБ), синтезированных на глицерине различной очистки

Таким образом, установлено, что при синтезе на глицерине происходят изменения физико-химических свойств полимеров, включающие снижение значений средневесовой молекулярной массы (до 304-416 кДа) и степени кристалличности (до 50 %); последнее является значимым, так как ПГА с пониженной степенью кристалличности более технологичны и обеспечивают получение изделий более высокого качества.

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

## ВЛИЯНИЕ ФРУКТОЗЫ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОГО С-СУБСТРАТА НА РОСТ И СИНТЕЗ ЗАПАСНЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ШТАММОМ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B-10646

К.Ю. Сапожникова

Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

E-mail: kristo.pretty@mail.ru

**Ключевые слова:** *Cupriavidus eutrophus* B-10646, фруктоза, биополимеры, поли(3-гидроксибутират), гранулы, липиды, жирные кислоты (ЖК)

*Cupriavidus eutrophus* – модельный организм, накапливающий в качестве резервных биомолекул ПГА, используя при росте самые разнообразные субстраты – от классических углеводов (фруктоза, глюкоза) до отходов различных производств (производство оливкового, пальмового масла) [1, 2]. Биополимеры этого класса обладают способностью к биодegradации, поэтому они имеют крайне широкий спектр применения: это медицинская сфера (имплантанты, шовный хирургический материал), сельскохозяйственная сфера (использование в качестве пористых носителей для депонирования пестицидов) и бытовые нужды (упаковочные материалы) [3].

**Цель работы** – физиолого-биохимическая характеристика бактерий *C. eutrophus* B-10646, выращиваемых в режиме накопления полимера на фруктозе в качестве основного С-субстрата.

Бактерии *C. eutrophus* B-10646 выращивали в минеральной среде Шлегеля в течение 72 ч. Для определения содержания полимера использовали газовую хроматографию с масс-спектрометрией. Гель-проникающую хроматографию применяли для измерения молекулярно-массовых характеристик полимера. Липополисахариды (ЛПС) выделяли горячим феноло-водным методом, а липиды цитоплазматической мембраны (ЛЦМ) – по методу Фолча. Жирнокислотный состав липидов определяли после получения метиловых эфиров жирных кислот, используя газовую хроматографию с масс-спектрометрией. Фотографии клеток бактерий получали с применением просвечивающей электронной микроскопии.

Урожай биомассы составил 7,8 г/л, содержание полимера, представленного гомополимером поли(3-гидроксибутиратом) П(ЗГБ) – 91,2% от сухой биомассы (рис. 1).

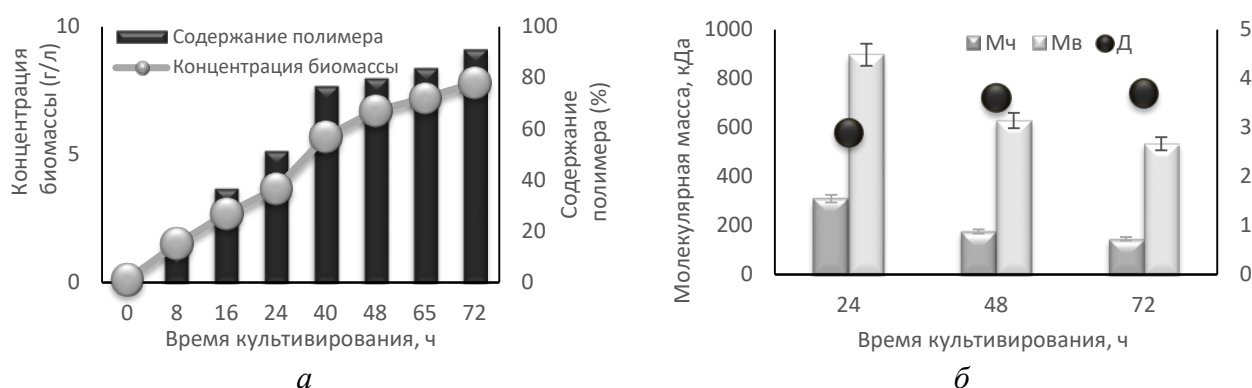


Рисунок 1 – Накопление биомассы и полимера *C. eutrophus* B-10646 (а) и молекулярно-массовые характеристики полимера (б)

Среднечисловая молекулярная масса ( $M_n$ ) и средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ) полимера в процессе культивирования снижались соответственно с 310 до 144 кДа и с 892 до 534 кДа. Однако полидисперсность (ПД) полимера возрастала с 2,7 до 3,8 (рис. 1).

Жирнокислотный состав ЛЦМ представлен насыщенными ЖК:  $C_{12:0}$ ,  $C_{14:0}$ ,  $C_{15:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ , в том числе циклопропановыми –  $s-C_{17:0}$  и  $s-C_{19:0}$ . и ненасыщенными ЖК:  $C_{16:1\omega7}$ ,  $C_{16:1\omega5}$ ,  $C_{18:1\omega9}$ ,  $C_{18:1\omega7}$ . Отмечено увеличение содержания насыщенных ЖК, в том числе и циклопропановых к концу культивирования бактерий. Основная часть ЖК липополисахаридов (ЛПС) представлена гидроксикислотами –  $\beta$ -ОН- $C_{12:0}$ ,  $\alpha$ -ОН- $C_{14:0}$ ,  $\beta$ -ОН- $C_{14:0}$ ,  $\alpha$ -ОН- $C_{16:0}$ ,  $\beta$ -ОН- $C_{16:0}$  (более 70% от суммы ЖК) (рис. 2).

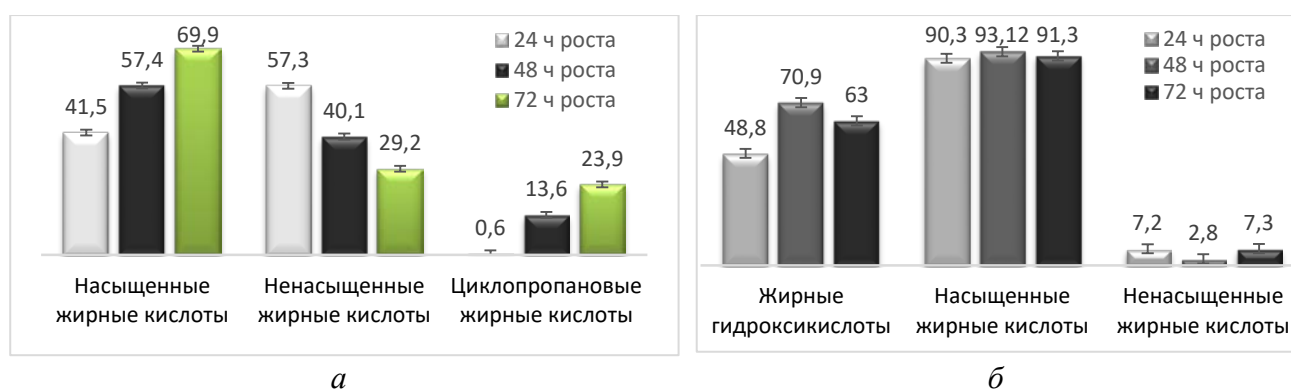


Рисунок 2 – Жирнокислотный состав липидов *C. eutrophus* B-10646: а – жирнокислотный состав ЛЦМ; б – жирнокислотный состав ЛПС

Для получения фотографий клеток использовали просвечивающую электронную микроскопию. Средняя длина клеток составляет от  $2,6 \pm 0,5$  мкм до  $2,9 \pm 0,2$  мкм на разных стадиях роста, ширина достоверно не изменяется и составляет  $0,8 \pm 0,1$  мкм. На всех этапах роста были обнаружены также и удлинённые клетки с нарушенным процессом деления, их доля увеличивается с 6% на 24 ч роста до 19 % (рис. 3).

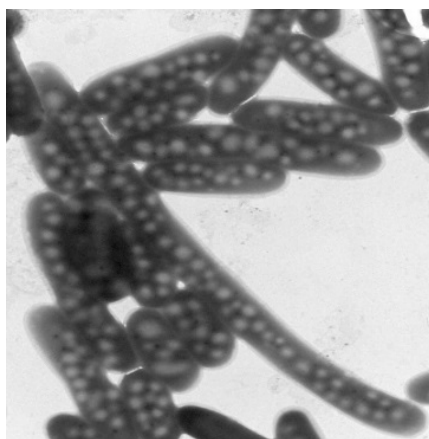


Рисунок 3 – Клетки бактерий *C. eutrophus* B-10646

Клетки запасают П(ЗГБ) в виде гранул в цитоплазме: на 24 ч роста среднее количество гранул на клетку составило  $9,5 \pm 0,5$ , далее, гранулы увеличивались в размере, некоторые сливались между собой, что привело к тому, что на 72 ч роста среднее количество гранул на клетку составило уже  $4,4 \pm 0,2$ .

Таким образом, фруктоза в качестве основного углеродного субстрата является перспективным субстратом как для роста штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646, так и для получения высоких выходов целевого продукта – поли (3-гидроксibuтирата).

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

#### **Литература**

1. Anderson, A. J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A. J. Anderson, E. A. Dawes // Microbiological reviews. – 1990. – Т. 54. – №. 4. – С. 450-472
2. Mravec, F. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy // F. Mravec et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Т. 363. – № 10. – С.94
3. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Progress in polymer science. – 2000. – Т. 25. – № 10. – С. 1503-1555.

## **СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРЫ 4-ГИДРОКСИБУТИРАТА**

**В.С. Безбидо**

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*E-mail: vbezvido@mail.ru*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, 4-гидроксibuтират,  $\epsilon$ -капролактон, *Cupriavidus eutrophus* B-10646

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные полиэфиры, синтезируемые бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода. [1]. Наиболее изученным является поли-3-гидроксibuтират (П(3ГБ)). Помимо П(3ГБ), более перспективны сополимерные ПГА, которые в зависимости от набора и соотношения мономеров имеют различные свойства. Сополимеры, содержащие в своем составе мономеры 4-гидроксibuтирата (4ГБ), являются биополимерами, признанными многообещающим биоматериалом для применения в медицине и фармацевтической промышленности [2].

**Цель работы** – исследование роста бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и синтез полимера, содержащего 4-гидроксibuтират, впервые используя в качестве источника мономеров 4ГБ –  $\epsilon$ -капролактон.

Бактерии *Cupriavidus eutrophus* B-10646 выращивали в стеклянных колбах в шейкер-инкубаторе при температуре 30 °С. В качестве основного источника углерода использовали фруктозу; в качестве предшественника 4ГБ –  $\epsilon$ -капролактон; в качестве предшественника 3-гидроксивалерата (3ГВ) – валерат калия. Содержание и состав полимера определяли с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Для определения молекулярной массы полимера использовали гель проникающую хроматографию (Agilent Technologies 1260 Infinity, США).

Исследовано влияние  $\epsilon$ -капролактона в концентрациях 1-5 г/л, добавляемого на 24 ч культивирования, на рост клеток и синтез полимера. Показано, что концентрации  $\epsilon$ -капролактона свыше 2 г/л ингибировали рост бактерий, однако содержание полимера в бактериях, культивируемых в присутствии всех исследуемых концентраций  $\epsilon$ -капролактона практически не отличалось и составляло около 60% от веса сухой биомассы (рисунок). Показано, что бактерии в присутствии всех концентраций  $\epsilon$ -капролактона включали в полимер мономеры 4ГБ. Самое высокое содержание 4ГБ (11,2 мол.%) получено при концентрации  $\epsilon$ -капролактона 6 г/л (см. рис.).

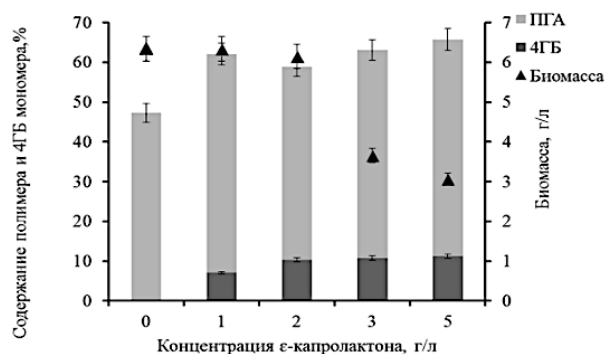


Рисунок – Концентрация биомассы бактерий *S. eutrophus* В-10646, содержание полимера и мономеров 4ГБ на 48 ч культивирования в присутствии различных концентраций  $\epsilon$ -капролактона

Для увеличения содержания мономеров 4ГБ в полимере  $\epsilon$ -капролактон добавляли в культуру бактерий порциями (не более 2 г/л в одной добавке) через 8-16 ч; общая концентрация  $\epsilon$ -капролактона, добавленного в культуру, составляла 4, 5 и 6 г/л. В конце эксперимента (72 ч) содержание полимера было сопоставимым для всех исследуемых концентраций  $\epsilon$ -капролактона (75-78% от веса сухой биомассы). Максимальное содержание 4ГБ (21,4 мол.%) наблюдали при концентрации  $\epsilon$ -капролактона 6 г/л.

Для синтеза трёхкомпонентного полимера, содержащего в своем составе мономеры 3ГБ и 4ГБ, на 48 ч или 24 и 48 ч добавляли валерат калия в концентрации 1 г/л;  $\epsilon$ -капролактон добавляли порциями (1 г/л) через 8-16 ч. Показано, что увеличение концентрации добавляемого валерата калия с 1 до 2 г/л приводило к возрастанию содержания 3ГБ в полимере с 7 до 15 мол.%; включение 4ГБ при этом составляло 20-23 мол.%.

Таблица – Физико-химические свойства ПГА с различным набором и соотношением мономеров 4ГБ и 3ГБ

Состав ПГА, мол%		$M_{числ}$ , кДа	$M_{вес}$ , кДа	ПД	$T_{пл}$ , °С	$T_{стек}$ , °С	$T_{крист}$ , °С	$T_{дегр}$ , °С
Гомополимер П(3ГБ)								
3ГБ = 100		368	920	2,5	178	–	92	295
2х-компонентные ПГА 3ГБ/4ГБ								
90	10	160	550	3,4	154	-3,5	68	297
84	16	95	598	6,3	167	-4,0	59	289
82	18	98	632	6,4	167	-4,0	52	286
79	21	103	665	6,5	167, 174	-	99	288
3х-компонентные ПГА 3ГБ/3ГВ/4ГБ								
72	5	23	111	4,9	168	-6,5	75	294
71	16	13	169	4,9	166, 174	-16,9	95	293
67	9	24	165	4,3	173	–	77	294
62	15	23	81	5,2	168	-7,5	65	297

- не обнаружено

Исследованы физико-химические свойства полученных полимеров, содержащих мономеры 4ГВ (таблица).

Показано снижение молекулярной массы полимеров, содержащих 4ГВ, по сравнению с поли(3-гидроксibuтиратом). Изучение температурных характеристик показало, что для полимеров с 4ГВ характерно более низкая температура плавления по сравнению с П(3ГВ).

Исследование свойств поверхности пленок из исследуемых полимеров, охарактеризованных на базе измерения контактных краевых углов смачивания водой и диодметаном, показало, что с увеличением содержания 4ГВ увеличивается гидрофильность поверхностей плёнок двухкомпонентных полимеров. У плёнок трехкомпонентных полимеров гидрофильность выше там, где одновременно высокое содержание 4ГВ и низкое содержание 3ГВ.

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

#### **Литература**

1. Amass, W. A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies / Amass, W., Amass, A., Tighe B // Polymer Int. – 1998. – Vol.47. – P. 89-144.

2. Muzaiyanah, A. R. Studies on the Microbial Synthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Containing 4-Hydroxyvalerate Using  $\gamma$ -Valerolactone / A. R. Muzaiyanah, A. A. Amirul // Biochemist Biotechnology – 2013. V. 170. P. 1194-1215.

## **СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРЫ 4-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА**

**М. Д. Косенок<sup>1</sup>, Н. О. Жила<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

<sup>2</sup>*Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия*

*E-mail: margaritadi@mail.ru*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, *Cupriavidus eutrophus*, 4-гидроксивалерат,  $\gamma$ -валеролактон, поли(3-гидроксibuтират-co-4-гидроксивалерат)

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются биополимерами, которые синтезируются многими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста, при избытке углеродного и энергетического субстрата в среде и дефиците минеральных элементов (азота, серы, фосфатов и др.), а также кислорода. Полимеры, содержащие 4-гидроксивалерат (4ГВ), принадлежат к классу термопластичных эластомеров.

**Цель работы** – исследование влияния  $\gamma$ -валеролактона на рост *Cupriavidus eutrophus* В-10646, состав и свойства синтезированного полимера.

Бактерии выращивали в периодическом режиме в течение 72 часов. В качестве основного углеродного субстрата использовали фруктозу. В качестве субстрата для синтеза 4ГВ использовали  $\gamma$ -валеролактон. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исходных образцов полимеров и в составе форм

исследовали с использованием хроматографа для гелипроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия). Свойства поверхности рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой и дийодметаном ( $\theta$ , град) с использованием оборудования KRUSS (Германия). Комплексный термический анализ ПГА проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («Mettler Toledo», Швейцария).

Рост бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и накопление полимера в периодической культуре исследованы при росте на фруктозе с добавлением  $\gamma$ -валеролактона в концентрациях 1-3 г/л в фазу активного роста бактерий (24 час культивирования). Показано, что ингибирования роста бактерий и синтеза полимера всеми концентрациями  $\gamma$ -валеролактона не было. Урожай биомассы и полимера составлял 7,4-7,6 г/л и 78-83 % от веса сухой биомассы, соответственно (рисунок). Установлено, что полимер, синтезируемый бактериями помимо ЗГБ, содержит включения ЗГВ и 4ГВ.

В ходе культивирования происходило постепенное увеличение ЗГВ и 4ГВ. Максимальное включение 4ГВ – 1,85 мол.%, показано при концентрации 5 г/л, содержание ЗГВ – составляло 5,56 мол.%.



Рисунок – Урожай биомассы *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и содержание полимера на 72 ч культивирования при выращивании на фруктозе с добавлением субстрата предшественника  $\gamma$ -валеролактона в концентрациях 0-3 г/л

Исследованы молекулярная масса полимера, температурные свойства и свойства поверхности полученных пленок. Среднечисловая и средневесовая молекулярная масса синтезированных полимеров меньше, чем у поли(3-гидроксибутирата) П(ЗГБ) (368 и 920 кДа) и составляла соответственно 152-202 и 475-609 кДа (таблица).

Таблица – Молекулярно-массовые характеристики и температурные свойства сополимерных ПГА с различным набором и соотношением мономеров ЗГВ и 4ГВ

Состав ПГА, мол.%			$M_n$ , кДа	$M_w$ , кДа	ПД	$T_{пл}$ , °C	$T_{дегр}$ , °C	$T_{стекл}$ , °C	$T_{крисл}$ , °C
П(ЗГБ)			368	920	2,5	178	295	-	107
3х-компонентные ПГА									
ЗГБ	ЗГВ	4ГВ							
96,16	2,88	0,96	202	609	3,0	160 170	296	-	97
93,90	4,69	1,41	176	572	3,3	158 171	294	-	104
92,59	5,56	1,85	152	475	3,1	159 171	298	-	101

Показано, что включение 3ГВ и 4ГВ сопровождается снижением температуры плавления. Изменений в температуре деградации не обнаружено. Показано, что поверхность пленок, изготовленных из полимера с самыми низкими включениями 3ГВ и 4ГВ, является более гидрофильной, чем у пленок из П(3ГБ) и у пленок с более высокими значениями 3ГВ и 4ГВ. У полимеров с более высокими включениями происходило значительное увеличение контактного угла с дийодметаном, что привело к снижению дисперсионной составляющей.

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

## **ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТОВ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СИНТЕЗА МОНОМЕРОВ 3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА НА РОСТ *CUPRIAVIDUS* *EUTROPHUS* В-10646 И СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРА П(3ГБ-со-3ГВ)**

**В.В. Фохт**

*Сибирский федеральный университет, пр-т Свободный 79, 660041, Красноярск,  
Российская Федерация*

*E-mail: fokht.vick@yandex.ru*

**Ключевые слова:** 3-гидроксивалерат, пропанол-1, пентанол-1, пропионовая кислота, биомасса, полигидроксиалканоаты

Ценным продуктом биотехнологии являются полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, так называемые полигидроксиалканоаты (ПГА). Особо перспективными ПГА являются сополимеры, имеющие низкую кристалличность и обладающие свойствами эластомеров. Однако синтез сополимерных ПГА является сложной биотехнологической задачей, так как для их получения в состав среды, как правило, необходимо внесение дополнительных источников углерода в качестве субстратов-предшественников (прекурсоров) целевых мономеров, которые в подавляющем большинстве ингибируют рост продуцентов и синтез полимера. Поли(3-гидроксибутират) (П(3ГБ)) является самым распространенным представителем ПГА. Однако П(3ГБ) имеет ограниченное применение в качестве термопластичного материала из-за высокой кристалличности и слабой эластичности. В связи с этим наибольший интерес вызывают сополимеры с включением мономера 3ГВ, характеризующиеся лучшими физическими свойствами. Включение этого мономера в цепь полимера снижает кристалличность и температуру плавления полимера. В настоящее время для синтеза сополимеров с 3ГВ используются различные субстраты-предшественники, например, спирты – пропанол-1 и пентанол-1.

**Цель работы** – изучение влияния ряда субстратов – предшественников синтеза 3ГВ, на синтез П(3ГБ-со-3ГВ) у бактерии *Cupriavidus eutrophus* В – 10646.

В работе использовали штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646, депонированный в ВКПМ. Изначально для исследования влияния спиртов на рост культуры были проведены серии коротких экспериментов. Бактерии выращивали в периодическом двухстадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА. В качестве основного углеродного субстрата использовали фруктозу. Начальная концентрация фруктозы составляла 10 г/л. В первой серии экспериментов в начале культивирования вносили добавки пропанола-1 в различных концентрациях (0 – 10 г/л). В качестве контроля использовали культуру без добавления пропанола-1. Длительность культивирования составила 4 часа. Вторая серия эксперимента была проведена по аналогичной схеме, но уже с



добавками в культуру пентанола-1. После определения влияния спиртов на рост бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646, был проведен эксперимент для повышения общих выходов биомассы клеток и сополимера П(ЗГБ/ЗГВ), а также для исследования влияния индукторов на синтез мономера ЗГВ. В течение культивирования делали добавки нужных субстратов в культуру в концентрациях, аналогичных исходным. В качестве субстрата-предшественника синтеза 3-гидроксивалерата (ЗГВ) в растущую культуру на 24 час культивирования делали добавки пропионата калия и пропанола-1 с концентрациями 1 г/л. Длительность культивирования составляла 48 ч. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A (США).

**Результаты.** Показано, что различные концентрации пропанола-1 (от 0 до 10 г/л) не оказывали подавляющего действия на рост культуры. Максимальная удельная скорость роста на фруктозе с добавлением данного субстрата была зарегистрирована при концентрации спирта 6 г/л и составляла 0,21 ч<sup>-1</sup>. В случае же с пентанолом-1, наблюдали значительное подавление роста бактерий. Снижение удельной скорости роста в 1,5 раза наблюдали уже при концентрации 0,5 г/л.

Урожай биомассы при росте на фруктозе с добавлением пропионата калия и пропанола-1 были сопоставимы и составляли, соответственно, 5,9-6,1 г/л от веса сухой биомассы. Содержание полимера в конце культивирования при использовании фруктозы с добавками в культуру пропионата калия составляло 56 % от веса сухой биомассы. Однако при росте на пропаноле-1 полимера было значительно меньше (24% от веса сухой биомассы). Обнаружено, что при использовании пропионата калия бактерии включали в полимер 3-гидроксивалерат, содержание которого составляло 12,6 мол. % в отличие пропанола-1, не приводящего к синтезу сополимеров с включением мономеров 3-гидроксивалерата.

## **ОСОБЕННОСТИ РОСТА, ЛИПИДНОГО ОБМЕНА И АККУМУЛЯЦИИ РЕЗЕРВНЫХ БИОМОЛЕКУЛ В КУЛЬТУРЕ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B-10646, КУЛЬТИВИРУЕМОЙ НА ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЕ**

**О.А. Богданова**

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*E-mail: Olga.bogdanova.97@mail.ru*

**Ключевые слова:** *Cupriavidus eutrophus*, олеиновая кислота, полигидроксиалканоаты, жирные кислоты, липополисахариды, внутриклеточные липиды, микроскопия

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, обладающие такими полезными свойствами, как биodeградация и биосовместимость. Одним из основных факторов, влияющих на стоимость ПГА, является углеродный субстрат. Для использования того или иного субстрата для получения ПГА в промышленных масштабах, необходимо сначала исследовать основные физиолого-биохимические особенности штамма-продуцента ПГА, культивируемого на исследуемом субстрате. Целью данной работы было изучение бактерий *C. eutrophus* B-10646 в периодической культуре при росте на олеиновой кислоте.

Бактерии выращивали в стеклянных колбах при температуре 30 °С и 200 rpm. В качестве углеродного субстрата использовали олеиновую кислоту (10-12 г/л). Общее содержание полимера в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных

кислот на хромато-масс-спектрометре (7890A/5975C, Agilent Technologies, USA). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гелепроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США). Липополисахариды экстрагировали из клеток бактерий методом с использованием горячего фенола. Липиды цитоплазматической мембраны экстрагировали по методу Фолча. Размеры клеток определяли при помощи электронной просвечивающей микроскопии на просвечивающем электронном микроскопе HT-7700, Hitachi.

При периодическом культивировании бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 в течении 72 ч на олеиновой кислоте выход биомассы составил  $6,7 \pm 0,8$  г/л с общим содержанием полимера  $91 \pm 5,5\%$  от веса сухой биомассы. Клетки синтезировали гетерополимер, содержащий включения 3-гидроксиварата 1,5-3%. Экономический коэффициент составил 0,76 г биомассы/г используемого субстрата. Средневесовая молекулярная масса полимера снижалась в ходе культивирования с  $693 \pm 2,5$  кДа до  $480 \pm 1$  кДа. Полидисперсность полимера увеличивалась с 3,2 до 3,7.

В таблице представлено распределение жирных кислот по фракциям липидов на разных этапах культивирования. Основной жирной кислотой внутриклеточных липидов была насыщенная 16:0. Ненасыщенные жирные кислоты представлены в основном 16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 9, 18:1 $\omega$ 9. Доля циклопропановых кислот возросла в 2 раза. Количество ненасыщенных жирных кислот превышало количество насыщенных.

Основной жирной кислотой липополисахаридов являлась  $\beta$ -ОН14:0, доля которой превышала 50%. Циклопропановых кислот в составе прочносвязанных липидов обнаружено не было. Основной насыщенной жирной кислотой являлась 14:0. Содержание моноеновых жирных кислот было минимальным и не превышало 5% от общего количества жирных кислот на всех этапах культивирования.

Микроскопические исследования клеток показало, что в культуре бактерий, находящихся в фазе активного роста, присутствовали клетки длиной от 1 до 4,8 мкм (рисунок).

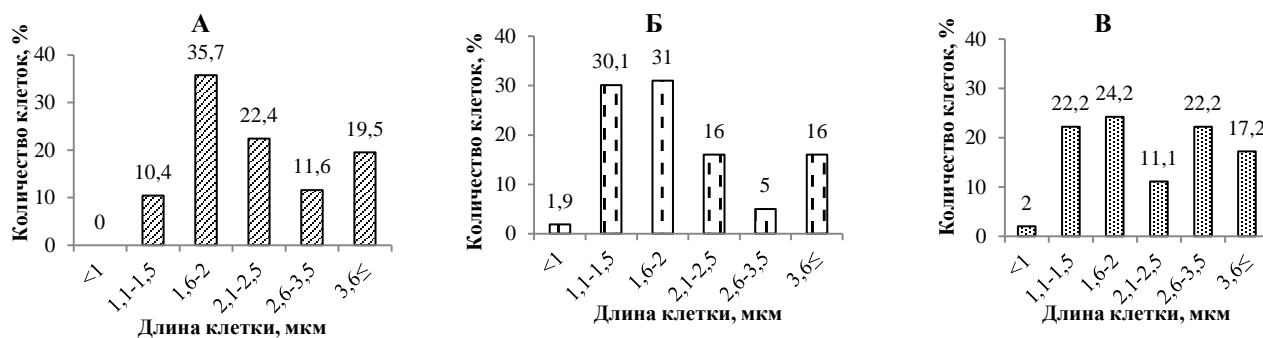


Рисунок – Процентное распределение клеток по длине: А – на 24 ч культивирования, Б – на 48 ч культивирования, В – на 72 ч культивирования

Клетки длиной 1,6-2,5 мкм занимали более 50% от общего числа клеток. Процентное распределение клеток, по их длине на 24 ч культивирования, представлено на рисунке А. Основная масса клеток (более 50%) в середине линейной фазы роста, при увеличении концентрации П(ЗГБ) до 60% имеет длину 1,1-2 мкм. Увеличение процента более коротких клеток, по-видимому, связано с активным делением (рис. Б). С наступлением стационарной фазы культуры (72 ч) в популяции доминировали клетки прежней длины (рис. В). В единичных количествах в популяции встречались гигантские клетки длиной 20-30 мкм. Данное явление связано с нарушенным делением клеток бактерий.

Таблица – Состав жирных кислот липидов бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646, выращиваемых на олеиновой кислоте, на разных стадиях культивирования

Кислота	ВЛ		ПСЛ		ВЛ		ПСЛ	
	24 ч		48 ч		72 ч			
14:0	2,9±0,1	18,9±1,3	2,5±0,4	22,3±1,5	3,1±0,2	21,0±1,6		
16:0	27,3±0,6	8,4±0,5	27,5±1,4	7,1±1,0	31,5±1,7	8,3±0,6		
16:1ω7	18,4±1,1	0,8±0,1	13,3±0,7	1,1±0,2	8,5±1,0	1,1±0,3		
С-17:0 <sup>а</sup>	5,1±0,3	-	6,8±0,8	-	8,9±0,3	-		
18:1ω9	20,4±1,3	1,2±0,3	24,1±2,1	0,6±0,1	23,4±0,9	0,3±0,1		
С-19:0 <sup>а</sup>	0,5±0,2	-	0,7±0,2	-	1,3±0,2	-		
β-ОН14:0	-	54,2±4,1	-	53,9±2,5	-	54,1±2,7		
Другие <sup>б</sup>	44,3±0,3	17,3±0,3	39,1±0,1	16,1±0,4	33,1±0,1	16,3±0,2		
ΣгидроксиЖК	0	58,6±0,2	0	60,3±0,1	0	59±0,3		
Σциклопропановые ЖК	5,6±0,2	0	7,5±0,2	0	10,2±0,4	0		
Σ насыщ. <sup>в</sup> / Σненасыщ. <sup>в</sup>	0,62	6,8	0,62	7	0,86	7,9		

- не обнаружено,

<sup>а</sup> – циклопропановая жирная кислота,

<sup>б</sup> – 10:0, 14:1ω5, 15:1ω6, 17:0, 17:1ω9,

<sup>в</sup> – насыщ. – насыщенные жирные кислоты, включая прямоцепочечные, циклопропановые кислоты и гидроксикислоты

ненасыщ. – ненасыщенные жирные кислоты

**Заключение.** Исследованы физиолого-биохимические свойства бактерий *C. eutrophus* В-10646 в периодической культуре при росте на олеиновой кислоте. Описаны характеристики роста бактерий, содержание и молекулярно-массовое распределение полимера, жирнокислотный состав липидов клеток, размерные параметры клеток. Показано, что олеиновая кислота является перспективным субстратом для синтеза ПГА.

## ВЛИЯНИЕ NaCl НА РОСТ БАКТЕРИЙ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В-10646 И СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРА ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ/3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ)

К.С. Болотова

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*E-mail: kris.alf95@gmail.com*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, NaCl, поли(3-гидроксибутират/3-гидроксивалерат), молекулярная масса

Полигидроксиалканоаты (ПГА) принадлежат к классу алифатических полиэфиров на основе гидроксикарбоновых кислот. ПГА синтезируются многими микроорганизмами, как место хранения углерода и энергии. ПГА по физико-химическим свойствам сходны с синтетическими полимерами, не разрушающимися в природной среде [1]. На выход полимера могут влиять различные факторы, такие как температура, рН среды, соленость и др. [2].

**Цель работы** – исследование способности бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* В10646 синтезировать сополимер П(3ГБ/3ГВ) в присутствии хлорида натрия в среде.

Бактерии *Cupriavidus eutrophus* В-10646 выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5л. Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля. В качестве

источника углерода использовали фруктозу (10-12 г/л). NaCl в концентрации 5 и 10 г/л добавляли в колбы в начале культивирования. В качестве контроля использовали среду без NaCl. Для синтеза сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) в колбы на 48 ч культивирования добавляли валерат калия в концентрации 1 г/л. Содержание и состав полимера определяли с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Для определения молекулярной массы полимера использовали гель-проникающую хроматографию (Agilent Technologies 1260 Infinity, США)

Исследовано влияние NaCl на рост бактерий *C.eutrophus* В-10646 и синтез полимера (рис. 1).

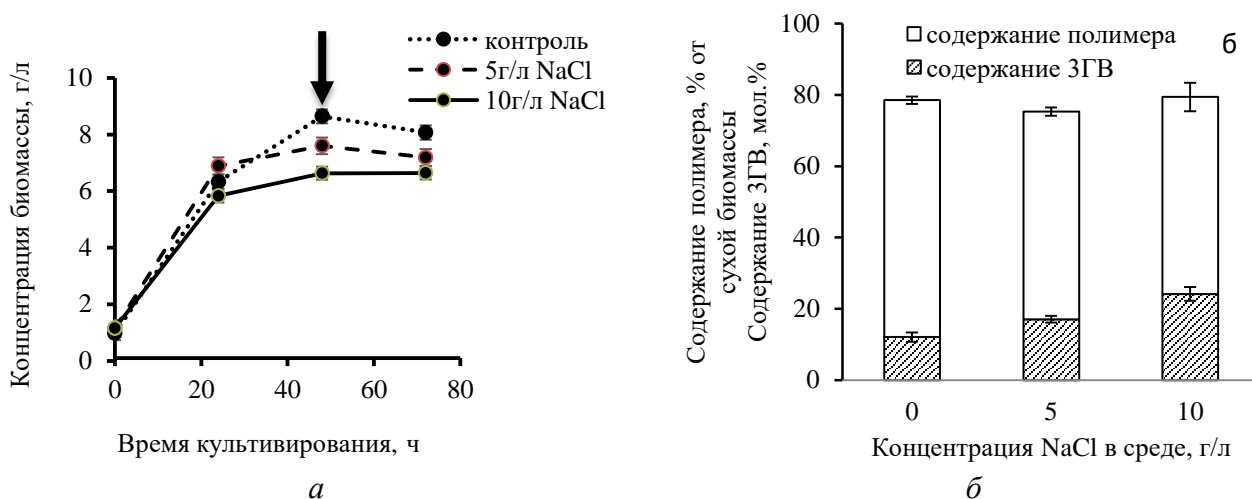


Рисунок 1 – Динамика накопления биомассы *C.eutrophus* В-10646 (а) и содержание полимера и ЗГВ в конце культивирования (72 ч) (б) при различных концентрациях NaCl в среде; стрелкой показано время добавления валерата калия

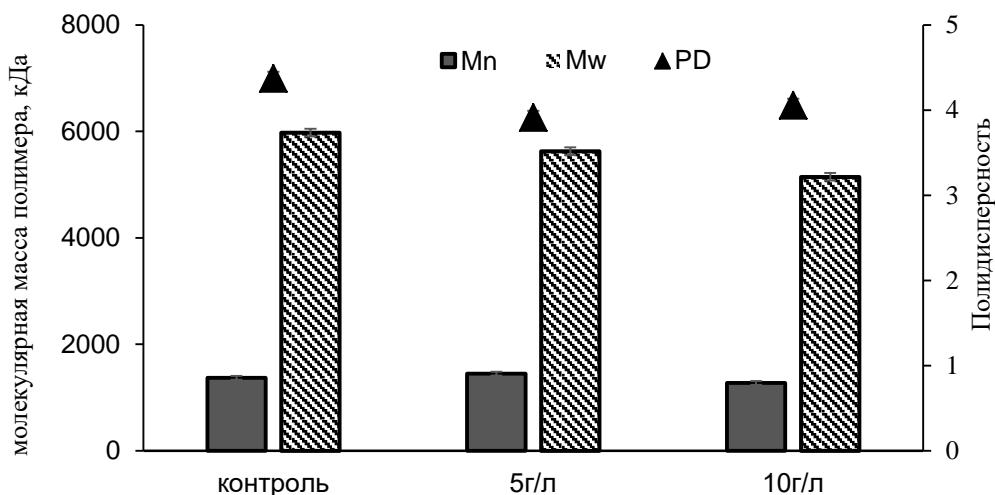


Рисунок 2 – Молекулярно-массовое распределение полимера, выделенного из клеток бактерий *C. eutrophus* В-10646 в конце культивирования (72 ч), выращенных в присутствии различных концентраций NaCl

Общий выход биомассы в конце культивирования (72 ч) составил 8,1 г/л, 7,2 г/л и 6,6 г/л в контроле и при концентрациях NaCl 5 г/л и 10 г/л, соответственно. На 72 ч культивирования достоверного отличия содержания полимера во всех образцах не обнаружено и составляло около 80% от веса сухой биомассы. Максимальное включение ЗГВ (24,2 мол.%) отмечено на среде, содержащей 10 г/л NaCl. В контроле содержание ЗГВ не превышало 12 мол.%.

Исследование молекулярно-массовых характеристик полимера показало, что среднечисловая молекулярная масса достоверно не отличалась и составляла 127-144 кДа. Между тем, средневесовая молекулярная масса с увеличением концентрации NaCl с 0 до 10 г/л в среде снижается с 597 до 514 кДа (рис. 2).

### Литература

1. Волова, Т.Г. Полиоксиканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишачкая. – Новосибирск : СО РАН, 2003. – 330 с.
2. Oren A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63(2):334-348.

## СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОНОМЕРЫ 3-МЕРКАПТОПРОПИОНАТА БАКТЕРИЯМИ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B-10646

С.С. Захарова

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

*E-mail: nzhila@mail.ru*

**Ключевые слова:** 3-меркаптопропионат, биомасса, молекулярная масса, температурные характеристики

Различные бактерии обладают способностью накапливать в клетках оптически активный полимер 3-гидроксимасляной кислоты в качестве источника углерода и энергии. Поли(-3-гидроксibuтират) П(ЗГБ) является биоразлагаемым и биосовместимым термопластом, однако ему присущи хрупкость и термическая нестабильность выше точки плавления. В последнее время исследуется синтез сополимеров, состоящих из ЗГБ и 3-меркаптопропионата (ЗМП). Эти микробные гомополиэфиры и сополиэфиры, содержащие в основной цепи серу, предоставлены в качестве представителя восьмого класса биополимеров. Микробные полиотиоэфиры – интересный материал из-за их физико-химических свойств, отличных от полиоксиэфиров, так как термическая стабильность у полиотиоэфиров лучше, чем у полиоксиэфиров. Таким образом, для полиотиоэфиров можно ожидать дальнейшего роста точки плавления или термического разложения, чего нельзя сказать об их кислородных аналогах. Одним из таких сополимеров, представляющих интерес для исследований, является сополимер поли(3-гидроксibuтират/3-меркаптопропионат).

**Цель работы** – изучение возможности получения сополимеров поли(3-гидроксibuтирата/3-меркаптопропионата) с использованием водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646.

**Материалы и методы.** Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5-1,0л, заполненных культурой на 50-60 % объема на термостатируемой качалке при температуре

30°C. Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля. Основным углеродным субстратом была фруктоза (10-12 г/л). Для синтеза сополимеров, содержащих ЗМП, в растущую культуру добавляли 3-меркаптопропионовую кислоту (ЗМПК) в концентрации 0,5-1,5 г/л. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A (США).

**Результаты.** Исследовано влияние ЗМПК на рост бактерий *C.eutrophus* B10646. В качестве предшественника для синтеза мономеров ЗМП использовали ЗМПК в концентрации 0,5, 0,7, 1 и 1,5 г/л. ЗМПК добавляли однократно на 24 ч культивирования. Концентрации ЗМПК 0,5-1 г/л не ингибировали рост бактерий и синтез полимера; концентрация клеток и содержание полимера в конце культивирования составляла 5,3-5,8 г/л и 55-60 % от веса сухой биомассы. Максимальное включение ЗМП (2,2 мол.%) в полимере зафиксировано при концентрации ЗМПК 1,5 г/л.

С целью увеличения включения ЗМП в полимер проводили эксперимент с дробным добавлением ЗМПК в концентрации 0,5 и 1г/л на 24, 30 и 48 ч культивирования бактерий. Варьируя количество добавок ЗМПК и время культивирования, получены образцы сополимеров с включением ЗМП от 9 до 32 мол.% и исследованы их свойства. Установлено, что с увеличением включения ЗМП, происходило увеличение полидисперсности полимера до 4,3-6,4 за счет снижения среднечисловой молекулярной массы до 135-195 кДа по сравнению с П(ЗГБ) (соответственно 3 и 240 кДа). Следует отметить, что средневесовая молекулярная масса этих образцов практически не отличалась и составляла 830-860 кДа. Измерение температурных характеристик образцов показало наличие двух пиков плавления: первый пик наблюдали в области температур 140-166 °С, второй пик при более высоких температурах – 173-178 °С. Температура деградации данного сополимера составляла 283-297 °С, что сопоставимо с данными для других типов ПГА с аналогичным включением короткоцепочечных и (или) среднечепочечных мономеров.

**Заключение.** Показано, что исследуемый штамм *Cupriavidus eutrophus* B10646 способен синтезировать сополимер поли(3-гидроксибутирата/3-меркаптопропионата) при добавлении в культуру 3-меркаптопропионовой кислоты.

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ БАКТЕРИЙ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B-10646 И СИНТЕЗ ПОЛИМЕРА

В. А. Хнытикова

Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

E-mail: hnytikova@mail.ru

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, температура, полимер, синтез

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода. Наиболее перспективными продуцентами для биотехнологического производства биоразрушаемых пластиков являются водородокисляющие бактерии *Cupriavidus eutrophus*, группа грам-отрицательных бактерий, способных накапливать до 80-90% полимера на сухое вещество. В первую очередь, перспективность водородокисляющих бактерий заключается в их высоком органотрофном потенциале.

**Цель работы** – исследование влияния температурного фактора на рост бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646 и синтез полимера.

**Материалы и методы.** Бактерии выращивали в стеклянных колбах, для выращивания за основу была принята среда Шлегеля. В качестве источника углерода использовали фруктозу. Выращивали на термостатируемой качалке при температуре 27 и 30 °С. Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометре. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гелепроникающей хроматографии относительно полистироловых стандартов.

**Результаты.** Исследовано влияние температуры на рост бактерий *C. eutrophus* В-10646 и синтез полимера. Культивирование происходило при температуре 27 и 30 °С (оптимальная температура). Общий выход биомассы в конце культивирования (72 часа) при температуре 27 °С составил 7,5 г/л; при 30 °С – 7,2 г/л. Содержание полимера в конце культивирования при 27 °С составило 61,5 % от веса сухой биомассы, а при 30 °С – 81,3 % от веса сухой биомассы. Исследование молекулярно-массовых характеристик полимера показало, что при 27 °С на 24 и 48 ч культивирования на хроматограмме распределения молекулярных масс полимера наблюдали 3 пика, что соответствовало высокомолекулярной, среднемолекулярной и низкомолекулярной фракциям полимера. При температуре 30 °С на 24 ч культивирования наблюдали только два пика, соответствующие среднемолекулярной и низкомолекулярной фракциям полимера. В конце культивирования при 27 °С и 30 °С полимер представлен одной фракцией, среднечисловая и средневесовая молекулярные массы которой составляли 200-220 и 800-840 кДа соответственно.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИВЕННО ВВЕДЕННЫХ НАНОАЛМАЗОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

Е.В. Инжеваткин<sup>1,2</sup>, А.В. Барон<sup>1,3</sup>, Н.Г. Максимов<sup>1,4</sup>, М.Б. Волкова<sup>1,3</sup>, А.П. Пузырь<sup>1,2</sup>,  
Н.О. Ронжин<sup>1</sup>, В.С. Бондарь<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ИБФ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН, <sup>2</sup>МНЦИЭСО ФИЦ КНЦ СО РАН, <sup>3</sup>Сибирский  
федеральный университет, <sup>4</sup>ИХХТ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

E-mail: maybemarina95@gmail.com

Совокупность физико-химических свойств детонационных наноалмазов (НА) (прежде всего, химический полиморфизм активной поверхности и возможности ее химической модификации, малая токсичность и высокая биосовместимость) позволяют прогнозировать их применимость для широкого спектра биомедицинских приложений. В частности, ученые многих стран изучают возможность использования НА как носителя для конструирования систем адресной доставки биологически активных веществ (в том числе, лекарственных препаратов) [1-5]. Предполагается, что создание средств избирательной доставки лекарств к очагам патологии позволит снизить дозы вводимых лечебных препаратов, повысит их эффективность и минимизирует риски возникновения побочных эффектов.

Использование наноматериалов в создании новых средств медицинского назначения (например, систем адресной доставки) предполагает возможность их введения в организм пациента. При этом возникает ряд важных вопросов, требующих всестороннего изучения.

Одним из них является четкое представление о распределении введенных в организм наночастиц, их биодеструкции или элиминации из организма после выполнения адресной наносистемой терапевтической функции. Особенно это важно в случае систем доставки на основе наночастиц, которые не подвергаются биодеструкции. Поскольку НА относятся именно к таким нанообъектам, возникает необходимость в изучении их межорганного распределения, накопления и путей элиминации после введения в организм. Важность этих исследований связана с возможностью возникновения нежелательных последствий при накоплении НА в органах и тканях. В этих целях может быть использован метод ЭПР-спектроскопии, который позволяет выявлять наночастицы, имеющие парамагнитные центры. Известно, что НА взрывного синтеза такие центры содержат [6, 7]. Недавно, мы показали применимость метода ЭПР для обнаружения модифицированных наноалмазов (МНА) в биоматериалах [8].

**Цель работы** – исследовать методом ЭПР-спектроскопии динамику распределения в организме животных внутривенно введенных МНА.

**Материалы и методы.** Для экспериментов использовали МНА со средним размером кластеров в гидрозольях –  $d_{50} = 70,6$  нм, которые были получены из взрывных наноалмазов российского производства (ООО «Реал-Дзержинск») разработанным ранее способом [9]. Исследования проведены на мышах ICR (самцы, масса 26-28 грамм), при работе с животными соблюдали принципы эвтаназии. МНА образуют устойчивые водные суспензии и применимы для биомедицинских исследований. Гидрозоль МНА вводили в хвостовую вену мышей в дозе 40 мг наночастиц на 1 кг веса. Через 2,5 часа и 10 суток после инъекции МНА животных использовали для исследований. Наличие МНА оценивали в крови и органах животных (печень, почки, легкие, сердце, головной мозг и мышцы бедра). Методические подробности получения, подготовки и анализа биообразцов (кровь и гомогенаты органов) методом ЭПР-спектроскопии изложены нами ранее [8]. ЭПР спектры регистрировали при температуре 85 – 90 К на ЭПР спектрометре Elexsys E580 (Bruker Corp., USA). Содержание МНА в образцах оценивали по величине характерного ЭПР сигнала ( $g = 2,003$ ,  $\Delta H \approx 10$  Гс), который пропорционален концентрации наночастиц в биоматериале [8].

**Результаты.** Методом ЭПР-спектроскопии в экспериментах было установлено, что через 2.5 часа после внутривенной инъекции МНА аккумулируются преимущественно в легких и печени мышей. Расчеты с использованием полученных ранее калибровочных зависимостей величин ЭПР сигналов от концентрации МНА в биообразцах [8] показали, что в легких и печени в это время аккумулируется около 25% и 20% МНА, соответственно, от дозы введенных наночастиц. При этом расчеты удельного содержания МНА на единицу веса органа, проведенные на основании данных ЭПР анализа биообразцов, свидетельствуют о гораздо большей (практически на порядок) эффективности накопления МНА в легких, по сравнению с печенью. На этом сроке исследований в сердце и почках животных методом ЭПР было зарегистрировано значительно меньшее (на 1–1,5 порядка) количество МНА, по сравнению с легкими и печенью. Следует сказать, что через 2.5 часа после инъекции в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра наличие МНА не было выявлено в пределах чувствительности использованного метода.

В исследованиях методом ЭПР-спектроскопии было выявлено перераспределение МНА в организме животных через 10 суток после инъекции наночастиц. Из расчетов удельного



содержания МНА в органах мышей следует, что на данном сроке исследований этот показатель в легких снижается почти в 3,5 раза, увеличивается в печени практически в 3 раза, отмечается аккумуляция МНА в селезенке. При этом значимых изменений общего содержания МНА в сердце и почках мышей не было выявлено, по сравнению с этим показателем для данных органов через 2,5 часа после инъекции наночастиц. Следует сказать, что через 10 суток после внутривенного введения МНА вновь не были зарегистрированы методом ЭПР в образцах крови, головного мозга и мышц бедра животных.

**Заключение.** В целом, результаты проведенных исследований демонстрируют применимость ЭПР-спектроскопии для изучения динамики межорганного распределения, накопления и элиминации детонационных наноалмазов при их внутривенном введении в организм экспериментальных животных.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-00999).*

### **Литература**

1. Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Puzyr A.P., Bondar V.S. Nanodiamonds as a carriers for address delivery of biologically active substances // *Nanoscale Res. Lett.* 2010. V.5. P.631-636.
2. El-Say Kh.M. Nanodiamond as a drug delivery system: applications and prospective // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2011. V.1. P.29-39.
3. Zhu Y., Li J., Zhang Y., Yang X., Chen N., Sun Y., Zhao Y., Fan C., Huang Q. The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems // *Teranostics.* 2012. V.2. P.302-312.
4. Zhang X., Wang A.Q., Liu M., Hui J., Yang B., Tao L., Wei Y. Surfactant-dispersed nanodiamond: biocompatibility evaluation and drug delivery applications // *Toxicol. Res.* 2013. V.2. P.335-342.
5. Kaur P., Badea I. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging // *Int. J. Nanomed.* 2013. V.8. P. 203-220.
6. Puzyr A.P., Bondar V.S., Bukayemsky A.A., Selyutin G.E., Kargin V.F. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds // *NATO Sci. Ser. II. Math. Phys. Chem.* 2005. V.192. P.261-270.
7. Солматова А.А., Ильин И.В., Шахов Ф.М., Кидалов С.В., Вуль А.Я., Явкин Б.В., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Баранов П.Г. Обнаружение методом электронного парамагнитного резонанса гигантской концентрации азотно-вакантных дефектов в детонационных наноалмазах // *Письма в ЖЭТФ.* 2010. Т.92. С.106-109.
8. Инжеваткин Е.В., Барон А.В., Максимов Н.Г., Волкова М.Б., Пузырь А.П., Бондарь В.С. Детекция наноалмазов в биологических образцах методом ЭПР-спектроскопии // *ДАН.* 2017. Т.477. С.738-741.
9. Пузырь А.П., Бондарь В.С. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью. Пат. РФ № 2252192 // *Бюл.* 2005. № 14.

## BIODEGRADABLE COMPOSITE SYSTEMS AS LONG TERM CARRIERS OF AGRICULTURAL PREPARATIONS

A.N. Boyandin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Av., Krasnoyarsk, 660041 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 50/50  
Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russia*

*E-mail: araneus@mail.ru*

**Keywords:** Poly(3-hydroxybutyrate); controlled release; release kinetics; herbicides; fertilizers

Intensive agricultural technologies require implementation of a wide variety of fertilizers and chemicals for pest and weed control. However, only a minor part of those chemicals applied and released into the environment reaches their target. The major part of them accumulates in the environment and biota, and pollutes soil and water. An actual area of focus is development of ecologically safe new-generation preparations with targeted and controlled agent release using special coating and/or matrices (carriers) from biodegradable materials. The key aspect of production of this type of preparations is availability of a suitable material possessing special properties including environmental safety, chemical compatibility with agricultural preparations, long-term storage quality and controlled degradability without forming toxic products. The purpose of this study was constructing and research of sustained release formulations of herbicide metribuzin and fertilizer ammonium nitrate with application of poly(3-hydroxybutyrate) and its composites.

**Materials and methods.** Poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) was synthesized according to previously described technology [1]. Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) and poly(ethylene glycol) were produced by Aldrich (USA). Wood flour was produced by pulverizing birch wood with an MD 250-85 wood-carving workbench (Stanko-Premier, Russia), dried at 60°C for 120 h, and separated for 0.5 mm particle size fraction. Metribuzin was purchased from “Ecolan” (Moscow, Russia). Ammonium nitrate,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , manufactured by Chudovoagrokhimservis (Russia) was used as the fertilizer. Other reagents and solvents of purity or high-purity grade were of different suppliers. Metribuzin was detected by gas chromatography. Nitrogen concentration in the soil was measured by the colorimetric method, using Nessler’s reagent.

Polymers were ground, and particle fractions under size of 1 mm were selected. In the metribuzin experiments, pure P3HB powder and its mixtures with birch sawdust, PCL and PEG powder at a source ratio of 7:3 were used for construction of pellets loaded with 25% metribuzin. Specimens obtained by mixing of powders (150 mg of pure P3HB or 105 mg of P3HB and 45 mg of the second component) with 50 mg of metribuzin were cold-pressed to tablets. In the ammonium nitrate experiments, pure P3HB powder and its mixtures with birch flour and PCL powder at a source ratio of 1:1 (i.e. 50% of P3HB and 50% of the other component) were used for construction of tablets loaded with 25% ammonium nitrate. Specimens prepared by mixing 90 mg filler powders (90 mg of pure P3HB or 45 mg of P3HB and 45 mg of the second component) with 30 mg of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  were cold-pressed by the same way; some of them were additionally coated by P3HB layer using dipping and casting solution technique.

**Results and discussion.** Among pure P3HB/PEG, P3HB/PCL, P3HB/wood powder, P3HB/PEG forms were the most actively degrading. In 35 days of observation their mass reduction totaled  $62.3 \pm 7.0\%$  from the original. It can most likely be explained by relatively fast erosion of water soluble PEG from the form and then it was followed by fast polymer degradation. For P3HB/PCL sample, slow mass reduction is specific, which lowered by  $49.4 \pm 11.1\%$  during the

whole observation period. The least degradable were P3HB/wooden powder and pure P3HB forms, which lost their masses by  $27.1 \pm 1.2\%$  and  $30.3 \pm 1.1\%$ , respectively, during the experiment.

Then, developed metribuzin forms were exposed to soil ecosystems in laboratory conditions during 35 days. Degradation of P3HB/filling material/metribuzin pellets was followed by metribuzin release from the polymeric carrier into soil. The fastest metribuzin release was recorded from P3HB/PEG samples, from which about 61% of the embedded herbicide was released into the field soil during the observation period. Metribuzin release was comparable with that from the other three forms; e.g., its concentration in the field soil gradually increased and reached 35-47% of the embedded amount. Efficiency of metribuzin systems were estimated in an experiment with test weed higher plant, creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). Significant herbicidal effect of developed forms was registered. In the negative control sample, grown biomass totaled 72 mg in 20 days. In all cases of embedded herbicide introduction, no growth appeared.

Investigation of degradation dynamics of nitrogen formulations revealed that the formulations based on pure P3HB and P3HB/wood flour composites showed comparable biodegradation rates, degradation rates of uncoated specimens being considerably faster than those of coated tablets. As wheat plants were growing and regularly watered, at the beginning of Week 2 of the experiment, the amounts of ammonium in soil began to decline, but the patterns of decline were different. In the negative control, the total amount of ammonium was originally below 0.5 mg, decreasing gradually over the course of the experiment and dramatically dropping (to 0.01 mg or lower) after Week 8. In the positive control, ammonium decreased rather slowly, from 7.3 mg after two weeks of the experiment to 0.02 mg by Week 12. In the treatments with uncoated formulations that had different compositions of the cores, about 5 mg of ammonium was contained in the soil after two weeks. Later, the ammonium level decreased but at a slower rate, and by the end of Week 5, it was higher than the ammonium level in the positive control (1.08-1.12 mg and 0.86 mg, respectively). This difference was retained throughout the rest of the experiment, reaching its maximum at the end of Week 8 (0.42-0.45 mg and 0.14 mg, respectively). In the treatment with coated formulations, ammonium was released at a considerably slower rate. After two weeks of the experiment, ammonium content in the soil (0.44-0.50 mg) was comparable to that in the negative control. Then, the amount of ammonium in soil increased gradually, reaching its maximum (1.2 – 1.3 mg) by the end of Week 4. After that, it decreased slowly, but remained higher than the levels obtained in the treatments with uncoated formulations. Evaluation of the increase in the biomass of spring wheat in the 12-week experiment showed that the use of the experimental fertilizer formulations was more effective than application of the fertilizer by the traditional method. In the treatments with uncoated formulations, the biomass increase was 12-20% higher than in the positive control at Week 4, and that was the greatest difference observed; by the end of the experiment, it had decreased to 8%. The effect of the coated formulations became evident later, by Week 8, but it was more pronounced, and in these treatments, at the end of the experiment, the biomass increase was more than 25% higher than in the positive control. Thus, the use of slow-release formulations alleviated nitrogen deficiency in wheat plants in the second half of the experiment, when the soil with the free fertilizer applied to it was actually nitrogen depleted.

**Conclusion.** Thus, controlled slow-release fertilizer and herbicide formulations based on matrices of P3HB and its composites are capable of maintaining necessary concentrations of active substances in soil and have necessary effect on plants. These experimental formulations can be used as prototypes for developing controlled-release agricultural formulations.

*This study was financially supported by Project “Agropreparations of the new generation: a strategy of construction and realization” (Agreement No 074-02-2018-328) in accordance with Resolution No 220 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”.*

## Reference

1. Volova TG., Kiselev EG, Vinogradova ON, Nikolaeva ED, Chistyakov AA, Sukovatyi AG, Shishatskaya EI. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. PLOS ONE 2014; 9:e87551.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ СМЕСЕЙ РАЗРУШАЕМОГО ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА С ПРИРОДНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

С. В. Барановский, А. Н. Бояндин, Е. Г. Киселев, А. П. Кузьмин, А. А. Шумилова

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

*E-mail: araneus@mail.ru*

Актуальное и экологически ориентированное направление – это использование полимерных материалов для создания препаратов с целью защиты культурных растений и снижающих риск неконтролируемого накопления и распространения пестицидов в биосфере. Интенсивные технологии ведения сельского хозяйства требуют применения огромного количества разнообразных химических веществ для борьбы с вредителями, сорняками и возбудителями болезней культивируемых видов. 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. Новейшим направлением исследований является разработка и применение препаратов с контролируемым выходом активного начала за счет использования биоразрушаемых материалов или специальных биоразрушаемых покрытий. Такие формы позволяют сократить объемы вносимых препаратов и обеспечивают их длительную и контролируемую доставку в течение вегетационного сезона, исключая резкие выбросы в окружающую среду, имеющие место при использовании свободных форм пестицидов. Ключевым моментом для создания препаратов такого типа является наличие адекватного материала, обладающего специальными свойствами. Перспективным материалом в качестве основы для депонирования сельскохозяйственных препаратов могут оказаться полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры микробиологического происхождения, для которых характерны биоразрушаемость до конечных продуктов ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ), высокая биологическая совместимость, механическая прочность, термопластичность, возможность получения смесей и переработки их в изделия различными методами из различных фазовых состояний. Однако в силу все еще достаточно высокой стоимости масштабы применения ПГА сдерживаются, в особенности для технических сфер, например в качестве разрушаемой упаковки и тары, а также материала для сельского хозяйства (пленочная и горшечная продукция, основа для депонирования и доставки удобрений и ядохимикатов и др.), масштабы которых огромны. Для снижения стоимости ПГА в настоящее время совершенствуются технологии их производства, в том числе за счет привлечения более дешевых субстратов. Помимо этого, существует еще один путь, – это использование ПГА не в чистом виде, а в смеси с более доступными материалами, что не только снижает затраты, но также оказывает влияние на свойства полимеров.

**Цель** – получение смесей ПГА с природными материалами, конструирование смесевых форм и исследование их свойств.

**Результаты.** Из поли-3-гидроксибутирата и природных материалов (глины, торфа, березовых опилок), существенно различающихся исходными свойствами (таблица), получено семейство смесей П(ЗГБ)/второй материал как 70/30 (% вес) в виде гомогенных

мелкодисперсных порошков и пасты (остаточная влажность 40 %). Для определения степени смешения компонентов в сформированных системах привлечены ДСК, X-Ray, ИК-спектроскопия. Наполнение полимера всеми материалами сопровождалось изменением их свойств. Например, степень кристалличности высококристалличного П(ЗГБ), наполненного материалами с низкими значениями  $C_x$ , снизилась наиболее значительно (до 47 и 48%) при использовании в качестве наполнителя торфа и опилок. Температурные характеристики полимера и материалов наполнителей – так же различны. При первом нагреве у глины имеется пик в области 100–200 градусов, однако при повторном нагреве данного пика нет, что говорит либо об удалении влаги и деструкции органической части присутствующей в глине, либо о реакции минеральных веществ между собой при повышении температуры. Чистый торф и опилки температур плавления и кристаллизации не имеют и характеризуются началом процесса деструкции связанным с образованием большого количества дыма. Начало деструкции торфа приходится на 130 °С, для опилок – на 220 °С. В целом, у смесей температурные характеристики близки таковым у П(ЗГБ). Для образца П(ЗГБ)/торф пик деградации приходится на 292 °С, однако деграционные процессы отмечаются на термограмме уже при 230 °С. Для смеси П(ЗГБ)/опилки начало процесса деструкции приходится на температуру 260 °С.

Таблица – Физико-химические свойства исходных материалов и полученных смесей

Образец	$C_x$ , %	$T_{\text{плав}}$ , °С	$T_{\text{кристал}}$ , °С	$T_{\text{дегр}}$ , °С
Исходные материалы				
П(ЗГБ)	75	176,4	108,7	287
Глина	53			
Торф	9			
Опилки	26			
Смеси				
П(ЗГБ)/глина	60	175,4	110,5	283
П(ЗГБ)/торф	48	175,4	107,0	273
П(ЗГБ)/опилки	47	176,0	108,0	292

Для выявления возможных структурных отличий полученных смесей привлечена ИК-спектроскопия, которую применяют для исследования структуры различных макромолекул. Так, по форме интенсивности полос в низкочастотной области возможно не только получение информации о соотношении упорядоченной и неупорядоченной фаз в смеси, но и определение характера взаимодействия компонентов в смесях. Сняты ИК-спектры П(ЗГБ) и трех исследованных материалов в диапазоне 400-4000  $\text{см}^{-1}$ , анализ которых показал не только наличие соединений углерода ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), характерных для всех исходных материалов, но и группы и соединения, характерные для конкретных наполнителей. Так, для опилок – это N, S и лигнин; для глины – Fe-O,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , Si-O,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; для торфа – S, N. По результатам ИК во всех смесях сохраняются характеристические полосы исходных компонентов – в спектрах смесей они видны либо в виде отдельных полос, либо в виде совмещенных пиков, в том числе и измененной формы. Небольшое различие в цифрах находится в пределах погрешности снятия спектра – 4  $\text{см}^{-1}$  (накопление 256 сканов). Новых видимых значимых полос в смесях не появляется, что позволяет предположить отсутствие новых химических соединений в концентрациях выше ~0,5%.

Различия свойств материалов наполнителей проявились в различиях структуры поверхности полученных прямым холодным прессованием таблетированных форм. Анализ РЭМ снимков поверхности форм показал, что с включением различных наполнителей микроструктура поверхности изменяется; зафиксировано образование пор и неровностей. При формировании таблеток из смеси П(ЗГБ)/опилки на поверхности отмечены впрессованные частицы опилок продолговатой формы, в случае с торфом – видны включения в виде несимметричных и разноостных пластинок. На поверхности форм из смеси П(ЗГБ)/глина видны включения глины, равномерно распределенные по всей поверхности.

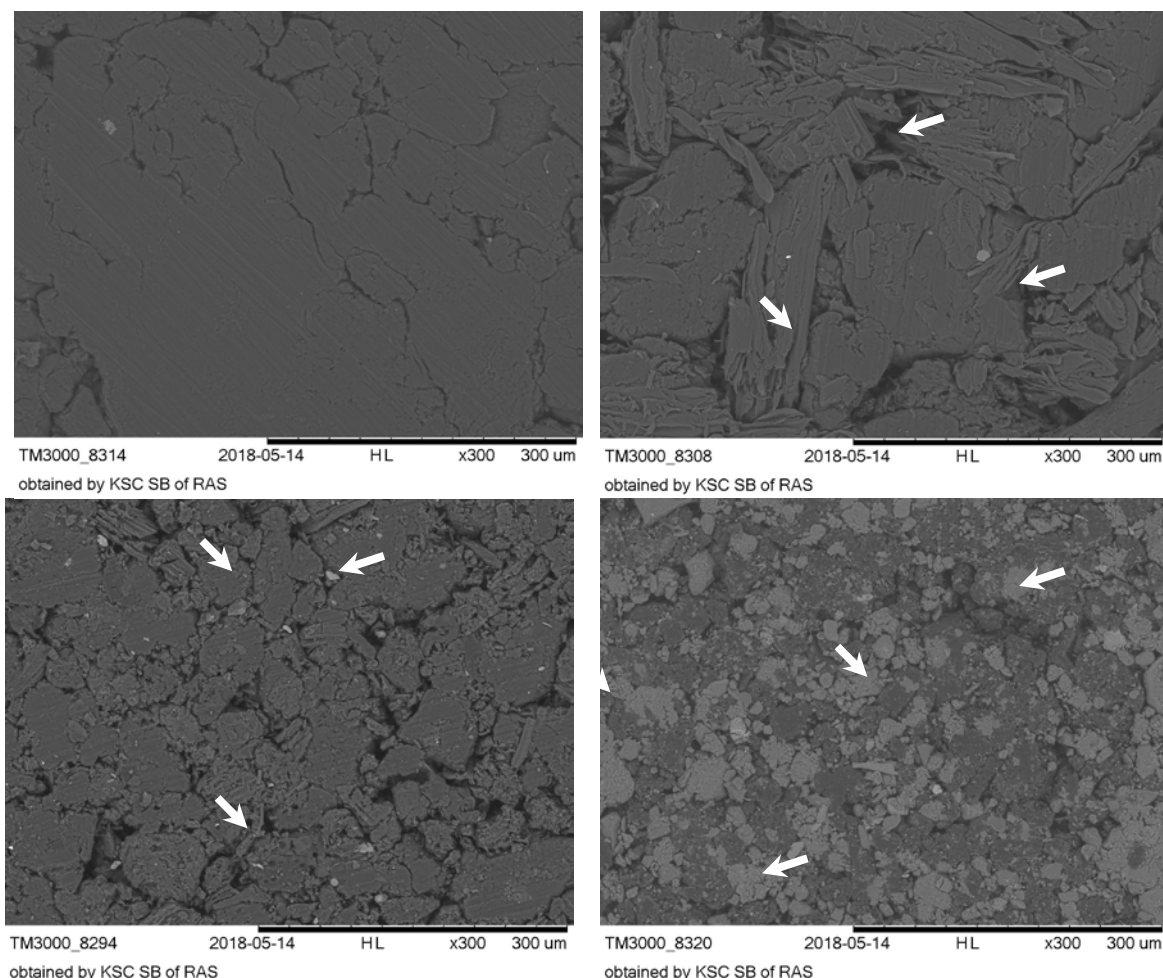


Рисунок – РЭМ снимки прессованных 3D-форм: 1 – П(ЗГБ); 2 – П(ЗГБ)/опилки; 3 – П(ЗГБ)/торф; 4 – П(ЗГБ)/глина

**Заключение.** Получено семейство смесей разрушаемого поли-3-гидроксибутирата с природными материалами в качестве наполнителей, из которых сконструированы формы в виде прессованных таблеток и гранулята. Анализ ИК-спектров, рентгенограмм и термограмм свидетельствуют об отсутствии химических связей между компонентами и физическом характере смесей, для которых характерны снижение температурных характеристик и пониженная степень кристалличности, что говорит об изменении кинетики кристаллизации смесевых образцов.

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

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРИМОСТИ ПОЛИЭФИРОВ В НЕГАЛОИДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

А.С. Хит<sup>1</sup>, А.Н. Бояндин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

E-mail: khit.ann@mail.ru

Получение и исследование биополимеров, прежде всего полиэфирной природы, обладающих высокой биосовместимостью с биологическими тканями и биоразрушаемостью в окружающей среде, в последние десятилетия стало одним из актуальных направлений многих наук, включая материаловедение, реконструктивную медицину, промышленную экологию. Важными задачами стали изучение закономерностей переработки полимеров в изделия и их направленной модификации с целью придания им новых свойств для конкретных приложений. Поскольку значительная часть технологий, связанных с решением этих задач, включает использование полимерных растворов, отношение биополимеров к растворителям является их важной характеристикой, влияющей на выбор способов и условий их процессинга в изделия. Применительно к наиболее распространенным биополиэфирам – полигидроксиалканоатам, полилактиду, поли-ε-капролактону, – соответствующие данные фрагментарны; в основном для получения их растворов используются хлорорганические растворители, которые токсичны, оказывают негативное воздействие при попадании в окружающую среду и достаточно реакционноспособны, чтобы препятствовать направленной модификации полимеров в растворе. Поэтому поиск альтернативных растворителей для использования в различных процессах, связанных с экстракцией, очисткой, модификацией и переработкой биополиэфиров в изделия, является актуальной задачей.

**Цель работы** – исследовать поведение полиэфиров в растворителях и подбор оптимальных растворителей для наиболее распространенных биополиэфиров.

В связи с целью, нами было поставлено несколько задач:

- 1) изучить растворимость каждого полимера в различных негалоидных растворителях экспериментальным путем;
- 2) зафиксировать температуру начала растворения полимера в растворителях, а также время застывания полимера в растворителе после окончания теплового воздействия;
- 3) с помощью полученных данных определить растворители, наиболее эффективно растворяющие конкретные полиэфиры.

**Материалы и методы.** В экспериментах использованы полиэфиры: полученные микробным синтезом поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)) и сополимер поли-3-гидроксибутират-3-гидроксиулавелат (ПГБВ), а также синтетические поли-L-лактид (ПЛ) и поли-ε-капролактон (ПКЛ). В качестве растворителей использовали диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФА), 1,3-диоксолан, 1,4-диоксан и тетрагидрофуран (ТГФ) с чистотой не ниже х.ч. или ч.д.а., приобретенные у различных производителей.

Каждый из четырех полимеров помещался во флаконы с пятью различными растворителями до итоговых концентраций (С, масса/объем) 1%, 2%, 5%. Для концентрации 1% 40 мг полимера помещалось в 3,96 мл растворителя, для 2% – 80 мг в 3,92 мл, для 5% – 200 мг в 3,80 мл. Образцы подвергались термическому воздействию в сушильном шкафу, начиная с температуры 50 °С. Каждые 30 минут температуру повышали на 5°С, отмечая изменение состояния образцов. В качестве максимальной температуры была принята температура растворения полимера или кратная 5 °С температура, близкая к температуре

кипения растворителя (189 °С для ДМСО, 153 °С для ДМФА, 75 °С для 1,3-диоксолана, 101°С для 1,4-диоксана и 66 °С для ТГФ), в зависимости от того, что достигалось раньше.

Если температура при очередном повышении достигала температуры кипения, но полное растворение полимера не было достигнуто, образец вынимали, фиксируя при этом как НР (не растворен).

**Результаты.** Исследование закономерностей набухания полиэфиров в растворителях показало (табл. 1), что наиболее активное набухание всех изученных полимеров отмечается в 1,3-диоксолане (при 50-55 °С) и 1,4-диоксане (при 50-60 °С), хотя в целом набухание отмечалось во всех растворителях при умеренных температурах, не превышающих 65°С.

Таблица 1 – Температура набухания полимеров в растворителях

Полимер	С,%	ДМСО	ДМФА	1,3-диоксолан	1,4-диоксан	ТГФ
П(ЗГБ)	1	65 °С	60 °С	60 °С	65 °С	60 °С
П(ЗГБ)	2	65 °С	60 °С	55 °С	60 °С	60 °С
П(ЗГБ)	5	65 °С	60 °С	50 °С	50 °С	60 °С
ПГБВ	1	65 °С	60 °С	55 °С	60 °С	60 °С
ПГБВ	2	65 °С	60 °С	55 °С	60 °С	60 °С
ПГБВ	5	65 °С	55 °С	50 °С	55 °С	55 °С
ПЛ	1	65 °С	50 °С	50 °С	50 °С	55 °С
ПЛ	2	65 °С	50 °С	50 °С	50 °С	55 °С
ПЛ	5	65 °С	50 °С	50 °С	50 °С	50 °С
ПКЛ	1	65 °С	60 °С	55°С	60 °С	65 °С
ПКЛ	2	65 °С	60 °С	55°С	55 °С	60 °С
ПКЛ	5	65 °С	60 °С	50°С	55 °С	60 °С

Растворение полимеров (табл. 2), в целом, также наиболее быстро протекало в диоксолане (при 50-75°С), причём наилучшей растворимостью обладал ПКЛ (полностью растворился при 50°С), а наихудшей – П(ЗГБ) (при 75 °С), что может быть связано с его известной высокой степенью кристалличности. Из исследованных полиэфиров наибольшей растворимостью обладал ПКЛ, растворившийся в диапазоне 50-60 °С во всех использованных растворителях.

Таблица 2 – Температура растворения полимеров

Полимер	С, %	ДМСО	ДМФА	1,3-диоксолан	1,4-диоксан	ТГФ
П(ЗГБ)	1	115 °С	100 °С	75 °С	90 °С	НР
П(ЗГБ)	2	115 °С	105 °С	75 °С	90 °С	НР
П(ЗГБ)	5	115 °С	110 °С	75 °С	95 °С	НР
ПГБВ	1	110 °С	105 °С	70 °С	95 °С	НР
ПГБВ	2	100 °С	110 °С	70 °С	95 °С	НР
ПГБВ	5	115 °С	110 °С	75 °С	100 °С	НР
ПЛ	1	105 °С	100 °С	60 °С	70 °С	65 °С
ПЛ	2	105 °С	100 °С	60 °С	НР	70 °С
ПЛ	5	105 °С	110 °С	60 °С	НР	75 °С
ПКЛ	1	55 °С	55 °С	50 °С	55 °С	55 °С
ПКЛ	2	60 °С	55 °С	50 °С	55 °С	55 °С
ПКЛ	5	60 °С	55 °С	50 °С	55 °С	55 °С

Диоксан растворял оба представителя класса ПГА при температурах, близких к температуре кипения (90-100 °С), и очень плохо (не более 1%) – ПЛ. В ТГФ растворились только ПКЛ и ПЛ; растворить ПГА не удалось, возможно, в связи с достаточно низкой



температурой кипения этого растворителя. ДМСО и ДМФА растворили все полимеры; при этом, кроме ПКЛ, остальные полиэферы растворялись при температурах от 100 °С и выше.

Поскольку в некоторых случаях (например, обработка низкокипящими реагентами) может быть желательно добиться стабильности раствора при температуре более низкой, чем температура растворения, исследовано поведение растворов после прекращения нагревания и при охлаждении до комнатной температуры (табл. 3). Отмечено, что растворы полигидроксиалканоатов после охлаждения желатинируются в течение 1-3 часов; реже (в системе ПГБВ-ДМФА) отмечалось выпадение осадка. В случае растворов ПЛ и ПКЛ в ДМСО и ДМФА отмечалась кристаллизация растворов по всему объему или выпадение осадка. Наконец, растворы синтетических полиэферов в 1,3-диоксолане, 1,4-диоксане и ТГФ сохраняли стабильность на протяжении длительного времени.

Таблица 3 – Поведение полимеров при охлаждении

Полимер	С, %	ДМСО	ДМФА	1,3-диоксолан	1,4-диоксан	ТГФ
П(ЗГБ)	1	Ж*, 1 час	Ж, 1 час	Ж, 3 часа	Ж, 3 часа	НР*****
П(ЗГБ)	2	Ж, 1 час	Ж, 1 час	Ж, 3 часа	Ж, 3 часа	НР
П(ЗГБ)	5	Ж, 1 час	Ж, 1 час	Ж, 3 часа	Ж, 3 часа	НР
ПГБВ	1	Ж, 1 час	ВО, 1 час	Ж, 3 часа	Ж, 3 часа	НР
ПГБВ	2	Ж, 1 час	ВО, 1 час	Ж, 3 часа	Ж, 3 часа	НР
ПГБВ	5	Ж, 1 час	Ж, 1 час	Ж, 3 часа	Ж, 3 часа	НР
ПЛ	1	ВО***, 1 час	К**, 3 часа	НЗ*****	НЗ	НЗ
ПЛ	2	К, 3 часа	К, 3 часа	НЗ	НЗ	НЗ
ПЛ	5	К, 3 часа	К, 3 часа	НЗ	НЗ	НЗ
ПКЛ	1	ВО, 1 час	К, 3 часа	НЗ	НЗ	НЗ
ПКЛ	2	ВО, 1 час	К, 3 часа	НЗ	НЗ	НЗ
ПКЛ	5	ВО, 1 час	К, 3 часа	НЗ	НЗ	НЗ

\*Ж – желатинировался

\*\*К – кристаллизовался

\*\*\*ВО – выпал осадок

\*\*\*\*НЗ – не застыл

\*\*\*\*\*НР – не растворился

**Заключение.** Проведенные эксперименты показали эффективность использования 1,3-диоксолана и 1,4-диоксана (а в случае ПЛ и ПКЛ – также и ТГФ) для получения растворов биополиэферов при приемлемых температурах, а также стабильность этих растворов на протяжении длительного времени, что делает возможным проведение манипуляций с ними при нормальной (комнатной) температуре.

### Литература

1. Волова Т.Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов // Журнал Сибирского федерального университета. Биология 2015; 8(2): 131-151.

2. Linnemann B, Sri Harwoko M., Gries Th. Polylactide fibers. Chemical Fibers International 2003; 6:426-433.

## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF P3HB MICROPARTICLES CONTAINING TEBUCONAZOLE

A.M. Shershneva<sup>1</sup>, A.V. Murueva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Federal University, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, 79  
Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

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

*E-mail: sheranna@inbox.ru*

**Keywords:** Poly-3-hydroxybutyrate, tebuconazole, encapsulation, microparticles, antifungal activity

**Introduction.** Over the past decade, uncontrolled use of pesticides in agriculture has caused bioaccumulation of agrochemicals in soil, leading to the loss of biodiversity and destroying habitats for living organisms. Fungicide toxicity to the environment can be reduced by using novel polymeric carriers enabling controlled release of the fungicide, which both increases the efficacy of agrochemicals and minimizes their adverse effects on the environment. Polymeric microparticles can act as transport media for active substances and offer advantages including improved physical, chemical, and biological stabilities, simple and reproducible preparation, and applicability to a wide range of agrochemicals.

The purpose of this study was to construct and investigate polymeric microparticles based on poly-3-hydroxybutyrate containing a fungicide – tebuconazole.

**Materials and Methods.** Polymer of  $\beta$ -hydroxybutyric acid (poly-3-hydroxybutyrate, P3HB) was used as a polymeric carrier for the fungicide. Microparticles were constructed using the emulsion technique.

The size of the microparticles was determined using a system for quantitative and qualitative particle analysis – FlowCam (FluidImaging, U.S.); a Zetasizer Nano ZS (Malvern, U.K.) particle analyzer was used to determine zeta potential. Surface morphology of microparticles was examined using scanning electron microscopy with an S-5500 microscope (Hitachi, Japan). The amount of the fungicide embedded in the microparticles was determined using chromatograph/mass spectrometer 7890/5975C (“Agilent Technology”, U.S.). Kinetics of TEB release from the polymeric microparticles was studied *in vitro* in laboratory water systems. The data obtained from *in vitro* experiments were fitted to various mathematical models to assess the TEB release kinetics.

The antifungal activity of P3HB microparticles containing TEB was investigated in experiments with phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium* (*F. moniliforme* and *F. solani*). As a positive control, we used the commercial TEB formulation (Raxil Ultra) at the same concentration; as a negative control, fungi were grown without TEB.

**Results.** In this study, tebuconazole (TEB)-loaded poly-3-hydroxybutyrate (P3HB)-based microparticles (10, 25, and 50%) were developed and comprehensively characterized. Encapsulation efficiency of TEB varied from 59 to 86%. As the loading amount was increased, the average diameter of microparticles increased too, from 41.3 to 71.7  $\mu\text{m}$ . Zeta potential of the microparticles was not influenced by TEB loading, varying between -32.6 and -35.7 mV (Fig).

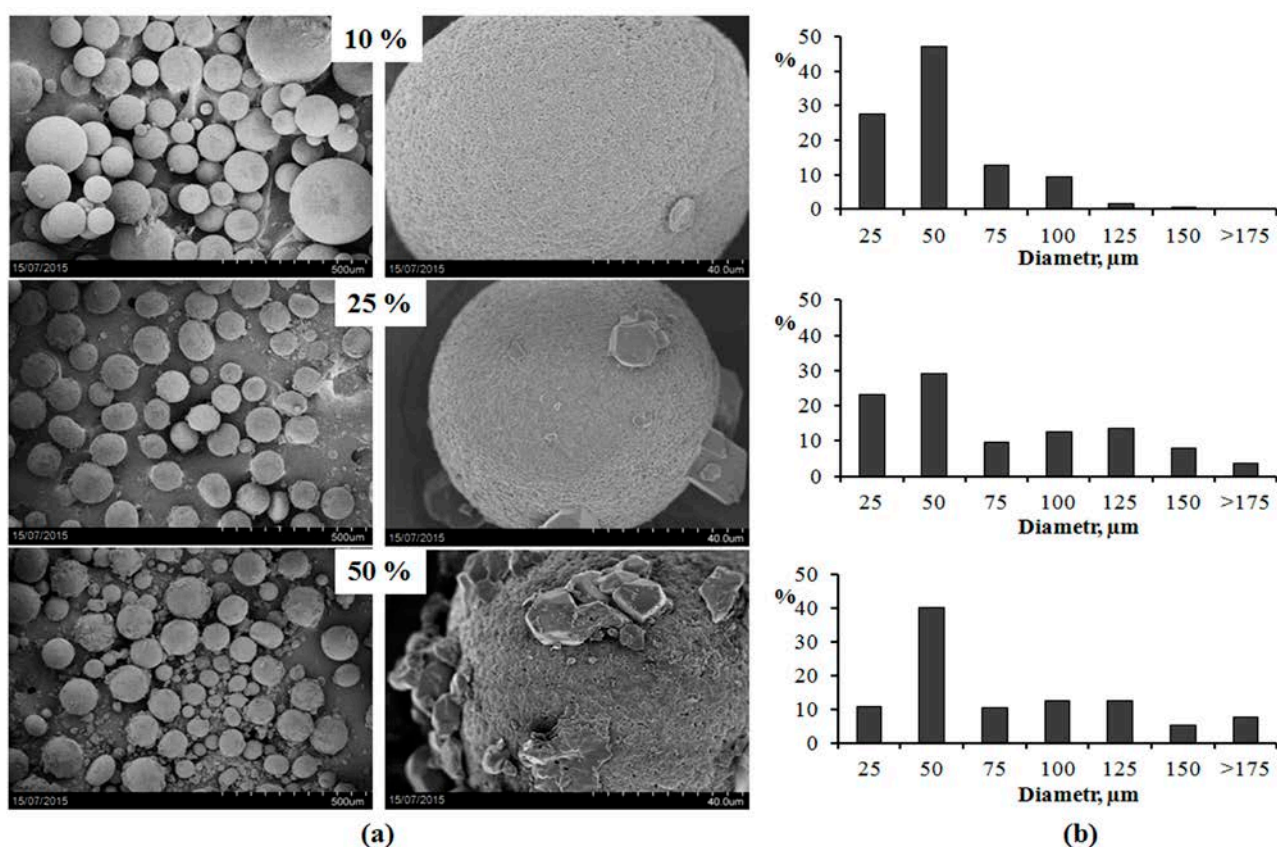


Figure – SEM images of P3HB/TEB microparticles with different TEB loading (10, 25, and 50% of the polymer weight) and their size distribution: 1, 2, and 3, respectively. Bars 500, 40, and 2 μm

TEB release from microparticles was studied in a laboratory aqueous environment. TEB was released gradually from 10, 25, and 50% loaded particles, and over 60 days, 25, 43, and 38%, respectively, of the initially loaded amount was released. The data obtained from *in vitro* TEB release were fitted to different mathematical models to predict the kinetics and fungicide release mechanism. Thus, the release profiles could be best explained by the Hixson–Crowell, Zero-order, and Higuchi models.

The antifungal activity of the P3HB/TEB microparticles against phytopathogenic fungi *F. moniliforme* and *F. solani* was comparable to that of the free fungicide. Thus, hydrophobic agrochemicals (TEB) can be effectively encapsulated into P3HB microparticles to construct slow-release formulations.

*This study was financially supported by Project “Agropreparations of the new generation: a strategy of construction and realization” (Agreement № 074-02-2018-328) in accordance with Resolution № 220 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”.*

## POLYMERIC MICRO- AND NANOPARTICLES AS A PLATFORM FOR ENCAPSULATION AND DELIVERY DRUGS BASED ON BIORESORBABLE POLYHYDROXYALKANOATES

A.V. Murueva<sup>1,2</sup>, A.M. Shershneva<sup>2</sup>, E.I. Shishatskaya<sup>1,2</sup>

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

*Siberian Federal University, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, 79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

*E-mail: goreva\_a@mail.ru*

**Keywords:** ceftriaxone, P3HB-microparticles, emulsification technique, spray-drying, drug release, microbiological evaluation

**Introduction.** Scientific research and development of innovative drug delivery systems is a rapidly developing area worldwide. This trend is going to be strengthened in the future, as the cost of health care requires reducing costs and improving the effectiveness of existing dosage forms.

By placing drugs in micro- and nanoparticles we can expect improved delivery to infected cells, increased bioavailability of drugs with poor absorption characteristics, prolonged drug residence time, targeted transport of therapeutic agents to specific organs, reduced toxicity and stability.

Among the huge variety of polymers, used to produce micro- and nanoparticles for drug delivery, polyhydroxyalkanoates (PHA) are widely use in controlled release applications, including the encapsulation of different antimicrobial drugs. This class of polyester attracts attention due to the presence of unique properties – natural origin, true biodegradation and biocompatibility. PHAs are thermoplastic, have less effect on pH values of tissues and have a longer *in vivo* degradation period, which allows them to be used for the development of prolonged drug delivery systems. It should be noted that spray drying is a popular way of depositing drugs in various polymer carriers, but with respect to PHAs this method has not been properly developed. Single examples of the use of spray drying for producing microparticles based on polyhydroxybutyrate (P3HB) loaded with paracetamol (Re, 2006).

Thus, the main objective of our study was the development of a delivery system for ceftriaxone in the form of polymer microparticles. Microparticles from P3HB and its mixture with polyethylene glycol (PEG) were obtained by the spray-drying technique and the emulsion method. Furthermore, to evaluate the effects of these methods and chemical composition on the properties of the microparticles ceftriaxone (CEF) release *in vitro*. Besides, microbiological evaluation of CEF-encapsulated PHA microparticles was also investigated *in vitro*.

**Materials and Methods.** P3HB with low molecular weight was produced at the Institute of Biophysics of the SB RAS by the microbial fermentation process. PEG (35000 Da) was purchased Sigma-Aldrich (USA), ceftriaxone – Farm-Center (Russia).

CEF-loaded microparticles were prepared by the solvent evaporation technique using emulsions and by spray-drying using Büchi B-290 Spray dryer (BÜCHI Laboratory Equipment, Switzerland, Flawil). To study the morphology of microparticles surface, the scanning electron microscopy of samples was performed S-5500 (Hitachi, Tokyo, Japan). The processing yields were defined as the percentage of the weight of microparticles compared to the weight of polymer in the initial solution. The size distribution, polydispersity index (PdI) and zeta potential of microparticles were determined by dynamic light scattering method on the Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK).

The quantity of CEF loaded into microparticles was determined on a UV-Vis spectrophotometer Cary 60 (Agilent Technologies, Selangor, Malaysia) by measuring the UV-Vis absorbance at 240 nm using pre-built calibration graphs. The experiment was carried out in triplicates. The controlled drug release from CEF-loaded microparticles was carried out in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) *in vitro*. The antibacterial activity of CEF-loaded microparticles was determined using the disc diffusion test for Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli*.

**Results.** In this study, PHAs-based microparticles are used to improve the therapeutic properties of CEF and render antibiotic safer. Microparticles were prepared by two methods, with a double emulsification technique and with a spray-drying (abbreviations are presented in Table). The encapsulation efficiency of CEF was about 60 % and 50 % for MP<sub>EM</sub> and MP<sub>SD</sub>, respectively.

Table – Sample composition and characterization of the obtained microparticles

Samples		Process yield, %	Particle size, $\mu\text{m}$	PdI	Zeta-potential, mV	Encapsulation efficiency, %
Emulsification technique						
P <sub>EM</sub>	P3HB	72.5	$0.74 \pm 18.82$	$0.187 \pm 0.063$	$-17.8 \pm 0.3$	-
PP <sub>EM</sub>	P3HB-PEG	39.0	$1.55 \pm 0.05$	$0.167 \pm 0.037$	$-28.0 \pm 0.4$	-
PC <sub>EM</sub>	P3HB- CEF	71.4	$0.89 \pm 0.02$	$0.250 \pm 0.003$	$-22.3 \pm 0.6$	66.0
PPC <sub>EM</sub>	P3HB-PEG- CEF	26.8	$1.55 \pm 0.01$	$0.297 \pm 0.027$	$-25.0 \pm 0.1$	60.5
Spray-drying						
P <sub>SD</sub>	P3HB	33.2	$6.51 \pm 0.47$	$0.211 \pm 0.058$	$-95.7 \pm 0.6$	-
PP <sub>SD</sub>	P3HB-PEG	51.1	$4.06 \pm 0.38$	$0.318 \pm 0.192$	$-37.5 \pm 2.2$	-
PC <sub>SD</sub>	P3HB- CEF	85.7	$4.21 \pm 0.70$	$0.260 \pm 0.118$	$-48.0 \pm 1.4$	50.6
PPC <sub>SD</sub>	P3HB-PEG- CEF	34.5	$3.84 \pm 0.27$	$0.224 \pm 0.058$	$-38.7 \pm 1.2$	47.0

It was shown that the surfactants used in the emulsion method affect on the electrophoretic activity of the microparticles. Therefore, the zeta potential of MP<sub>EM</sub> was lower than that of MP<sub>SD</sub> by an average of 3 times. The addition of PEG to the P3HB solutions had important influence on the surface morphologies and microstructures of microparticles; however, the effect on drug release rate was clearly expressed only for MP<sub>EM</sub> (Fig)

The total release of CEF from MP<sub>EM</sub> and MP<sub>SD</sub> had significant difference, which is most likely related to the localization of the drug molecules in the microparticles. So, the CEF release of MP<sub>SD</sub> reached 100% after 150 hours, while for MP<sub>EM</sub> the total release of CEF did not exceed 34% for the entire observation period. The release profiles could be best explained by Zero order kinetics model, Higuchi and Korsmeyer-Peppas models, as the plots showed high linearity.

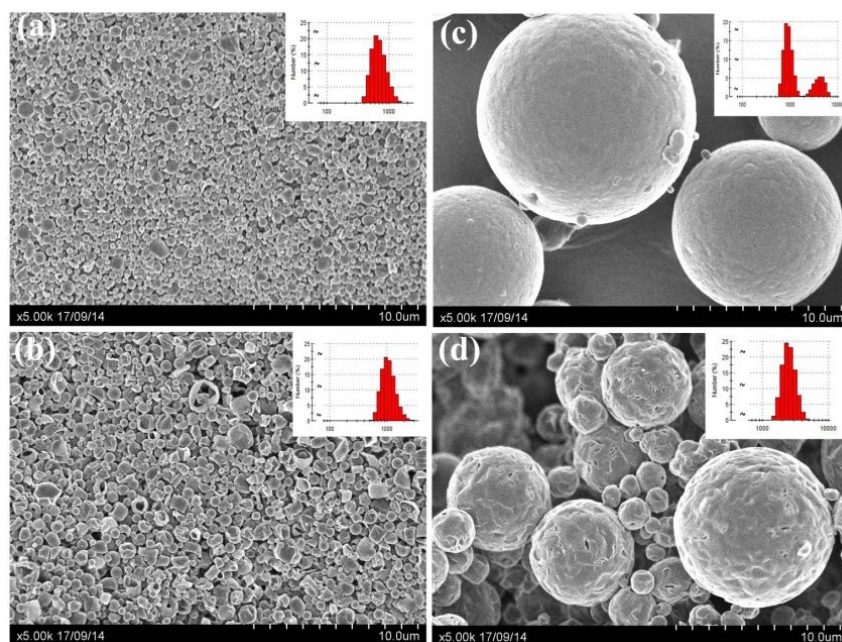


Figure – SEM images and size distribution of microparticles with CEF: a – PC<sub>EM</sub>; b – PPC<sub>EM</sub>; c – PC<sub>SD</sub>; d – PPC<sub>SD</sub> (all images share the same scale bar)

The bactericidal effect of MP<sub>EM</sub> and MP<sub>SD</sub> with and without CEF was investigated in cultures of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by disk diffusion test. MP<sub>SD</sub> with CEF showed higher antibacterial activity (ZOI over 22.0 mm) in comparison to MP<sub>EM</sub> (ZOI not more than 5.1 mm).

**Conclusion.** Thus, PHAs-based CEF-loaded microparticles were obtained, with satisfactory indicators of the effectiveness of encapsulation, drug outflow and preservation of therapeutic activity *in vitro*. Thus, using various methods, the possibility of inclusion CEF with satisfactory indicators of the effectiveness of encapsulation, drug outflow and preservation of therapeutic activity *in vitro* into the composition of P3HB-carriers is shown, which allows to conclude that this class of polymers is promising for the development of long-acting dosage forms.

## ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО РЕЛЬЕФА БИОПОЛИМЕРОВ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ МОНОЦИТОВ-МАКРОФАГОВ *IN VITRO*

Е.И. Шишачкая<sup>1</sup>, Н.Г. Мензянова<sup>1</sup>, С.В. Пятинина<sup>1</sup>, Д.П. Столяров<sup>2</sup>,  
Д.Б. Дрыганов<sup>2</sup>, Е.П. Сахнов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

<sup>2</sup>Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии, ул. Караульная 45, Красноярск, Россия

E-mail: shishatskaya@inbox.ru

Перспективы развития технологий регенеративной медицины в настоящее время связывают с инжинирингом эпигенетически активных поверхностных рельефов эндопротезов, способных репрограммировать клеточный эпигеном через системы механо-химического сигналинга. В идеале, этот подход позволит проводить «перепрограммирование» макроорганизма из состояния, вызвавшего заболевание. Алгоритм

конструирования поверхностных рельефов изделий из различных материалов, используемых для восстановления тканей, не разработан; скрининг эпигенетической активности поверхностной топографии проводят в различных клеточных системах *in vitro*. При этом развитие многих патологий сопровождается перестройками эпигенома, и результаты скрининга в условиях нормы и патологии существенно различаются. Поэтому в зависимости от задач скрининга требования к клеточным тест-системам специфичны.

**Цель работы** – скрининг перспективных поверхностных рельефов материалов, предназначенных для изготовления внутрисосудистых стентов. Моноциты-макрофаги (МН-МФ) играют решающую роль в патогенезе атеросклеротических бляшек и в развитии рестенозов после стентирования. Это определило использование в качестве тест-объекта этих клеток, которые выделяли из крови пациентов непосредственно перед операцией стентирования и через день после установки стента. Поляризацию МН-МФ проводили на поверхности биополимерных пленок из полигидроксиалканоатов (ПГА) различного состава с различными вариантами рельефного профиля. Для оценки поляризации использовали морфологические параметры и показатели активности продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

**Результаты.** На активность процессов полиплоидизации МФ влияют многие факторы, – слияние клеток, их подвижность, соотношение различных морфологических классов, концентрация интерлейкина-6 и пр. Показано, что активность процессов полиплоидизации МФ в культуральной среде на 6-е сутки культивирования значительно варьировала в зависимости от особенностей поверхностной топографии полимерных пленок. При этом концентрация интерлейкина-10, маркера М2-поляризации, противовоспалительный фенотип МФ была сопоставимой для всех вариантов поверхностного рельефа и не отличалась от контроля (культуральный пластик). После установки стента характер вариабельности изученных параметров МН-МФ пациентов значительно изменялся по сравнению с таковыми у МН-МФ до стентирования.

Полученные результаты показали, что особенности поверхностного рельефа полимерных пленок влияют на процессы дифференцировки МФ и поляризацию *in vitro*. Однако эффекты влияния поверхностной топографии зависят также от функционального статуса моноцитов в периферической крови пациента (до и после установки стента). На основе полученных результатов для дальнейших исследований выбраны наиболее перспективные варианты поверхностного рельефа пленок из ПГА определенного химического состава.

*Работа выполнена в рамках Гранта РФФИ №17-15-01352 «Изучение молекулярных маркеров моноцитов-макрофагов у больных атеросклерозом при взаимодействии с бионанополимерными материалами», 2017 – 2019 гг.*

## **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОСФЕРИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (БАВ) ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ**

**А.В. Владимирова<sup>1</sup>, А.М. Шершнева<sup>1</sup>, А.В. Муруева<sup>2</sup>, Е.И. Шишачкая<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79,

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

E-mail: Aleksa-vladimirova@yandex.ru

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, ПГА, П(ЗГБ), П(ЗГБ)-со-П(ЗГВ), антисептики, системы контролируемой доставки, пролонгированный эффект, ранозаживление

**Введение.** Возможность доставки и контролируемого высвобождения терапевтических агентов в раневые очаги является важным аспектом развития регенеративной дерматологии. Быстрый и эффективный процесс заживления ран значительно снизит расходы на ведение пациентов, уменьшит объём средств для перевязок и препаратов. Развитие полимерных биотехнологий может улучшить материалы и конструкции, используемые при местном лечении ран и повреждений кожи, для применений в качестве средств направленного действия для противомикробных, противовоспалительных и ускоряющих регенерацию препаратов с использованием новых соединений [1]. Философия локальной доставки антисептиков для ускорения заживления повреждений кожи заключается в том, чтобы повысить уровень антимикробных препаратов в тканях до уровня, на котором ингибируются чувствительные и относительно нечувствительные организмы, и избежать потенциальных побочных эффектов [2].

**Цель работы** – создание носителей для контролируемой доставки биологически активных веществ, в виде микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов, и изучение их функциональных характеристик, с оценкой эффективности *in vitro*, для потенциального применения в дерматологии.

**Материалы и методы.** В работе использованы поли(3-гидроксibuтират) с молекулярным весом 1200 кДа и сополимер 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом, 1500 кДа, содержание ЗГВ 11%. В качестве лекарственных препаратов для инкапсулирования в ПГА-микрочастицы использовали антисептики для местного применения – бриллиантовый зеленый, «Мирамистин», «Фурацилин». Микрочастицы получали эмульсионным методом, из 2%-х растворов П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), с включением в состав полимерной матрицы-носителя антисептических препаратов из водной фазы. Проведен анализ характеристик полученных микрочастиц, с замером электрокинетического дзета-потенциала на Zetasizer Nano ZS «Malvern», Великобритания. Включение препаратов в полимерную матрицу определяли спектрофотометрированием, по его исходной и остаточной концентрации в эмульсии, при излучении на длине волны 625 нм для бриллиантовой зелени, 260 нм для мирамистина, и 365 нм для фурацилина, на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, США. Для исследования выхода препаратов *in vitro* использован сбалансированный фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 в качестве модельной среды, отвечающий общим характеристикам плазмы крови и раневому экссудату человека. Проверка антисептического действия частиц проведена в культурах *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Изучение возможной цитотоксичности микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ)-со-П(ЗГВ), нагруженных антисептическими препаратами, проведено на НИН ЗТЗ, в количестве  $6 \times 10^4$  клеток на лунку при непосредственном контакте с частицами. Использовали обычную среду, с добавлением 10 мг частиц в лунку, в четырёх повторностях для каждого типа частиц, и определением среднестатистических значений. Эффективность полученных систем контролируемой доставки антисептиков оценивали по сравнению со свободными лекарственными формами тех же препаратов, в равных дозах.

**Результаты.** Получены микрочастицы из обоих типов ПГА и исследованы их функциональные характеристики для каждого препарата.

Измерение масс урожаев микрочастиц проводили в 4 повторностях, для определения выхода микрочастиц, который составил 92,0% и 94,5% от исходной массы полимера для П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), соответственно.

Микросферы из ПГА с антисептиками бриллиантовый зеленый, «Фурацилин» и «Мирамистин» получены при испарении растворителя из 3х-компонентной эмульсии. Размер



частиц определен в диапазоне от  $5,64 \pm 0,17$  до  $94,81 \pm 2,40$  мкм,  $\zeta$ -потенциал – от  $-0,8 \pm 0,40$  мВ до  $-27,5 \pm 0,95$  мВ. Эффективность инкапсулирования составила от 80,0 до 98,8 %. Характер профиля высвобождения антисептиков *in vitro* показал, что около 35 % (масс.) бриллиантового зеленого и 26 % Фурацилина (масс.), от включенного постепенно вышло из микросфер в течение месяца. Минимальная концентрация антисептиков, которая подавляет рост бактерий, составила 20 мг/л и для бриллиантового зеленого, и для Фурацилина.

Полученные данные свидетельствуют об относительной стабильности частиц из ПГА обоих составов, с включением бриллиантового зеленого и фурацилина. Частицы с Мирамистином по результатам работы относятся к очень мелким и вследствие этого нестабильным в суспензии. Возможно, этот результат обусловлен особенностями смешивания этого препарата с материалом-матриксом и нуждается в дальнейшем изучении.

**Заключение.** Результаты свидетельствуют о том, что частицы из ПГА обоих составов пригодны для нагружения антисептиками, с удовлетворительными показателями эффективности инкапсулирования, высвобождения препаратов и стабильности в модельной среде *in vitro*. Оценена эффективность действия микрочастиц с различными антисептическими препаратами в культуре патогенных и условно патогенных микроорганизмов, а также цитотоксичность по отношению к модельной культуре клеток соединительной ткани *in vitro*, полученные результаты позволяют отнести экспериментальные лекарственные формы антисептиков для местного лечения повреждений кожи на основе ПГА к состоятельным.

#### Список литературы

1. Andreu, V. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds / V. Andreu, G. Mendoza, M. Arruebo // *Materials* (Basel). – 2015. – Vol. 8, № 8. – P. 5154–5193.
2. McDonnell, G. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance / G. McDonnell, A. D. Russell // *Clin Microbiol Rev.* – 1999. – Vol. 12, № 1. – P. 147–179.

## ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ РАН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ

Е. Николаева<sup>1</sup>, А. Шумилова<sup>2</sup>, И. Шидловский<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79,

E-mail: nikolaeva-lena@mail.ru

Актуальное и быстро развивающееся направление, ориентированное на восстановление дефектов кожных покровов, – это тканевая инженерия и создание биотехнологических дермальных эквивалентов. Использование потенциала клеточных технологий в реконструктивных целях реализуется с использованием нескольких подходов. В одном из вариантов суспензию клеток необходимого фенотипа, выросших *in vitro*, вводят в поврежденные ткани органов или в кровоток. В другом, технологически более сложном, клетки выращивают вне организма на матриксе (скаффолды); далее биоинженерную конструкцию или сформированную ткань имплантируют реципиентному организму.

**Цель работы** – исследование эффективности применения биотехнологических раневых покрытий на основе разрушаемых сополимеров (П(ЗГБ/4ГБ)) и бактериальной целлюлозы (БЦ) для заживления модельных ожогов кожных покровов.

**Материалы и методы.** Экспериментальные биотехнологические раневые покрытия в виде гибридных систем П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ и гибридов, нагруженные стимуляторами ранозаживления (актовегин или фибробласты, дифференцированные из ММСК) (рис.1), исследованы на модели ожоговых ран III степени лабораторных крыс Вистар.

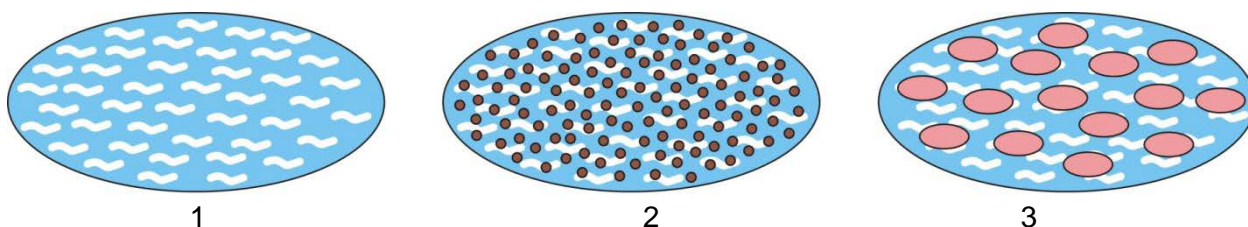


Рисунок 1 – Схематическое изображение биотехнологических раневых покрытий на основе гибридов из резорбируемых полигидроксиалканоатов и бактериальной целлюлозы, нагруженных ранозаживляющими факторами: 1 – П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ; 2 – П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ/актовегин; 3 – П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ/фибробласты

**Результаты.** По данным гистологических исследований на третьи сутки эксперимента во всех исследуемых группах зона некроза характеризовалась выраженными деструктивными изменениями эпидермиса, дермы и подкожной жировой клетчатки с тотальной гибелью придатков кожи (рис. 2).

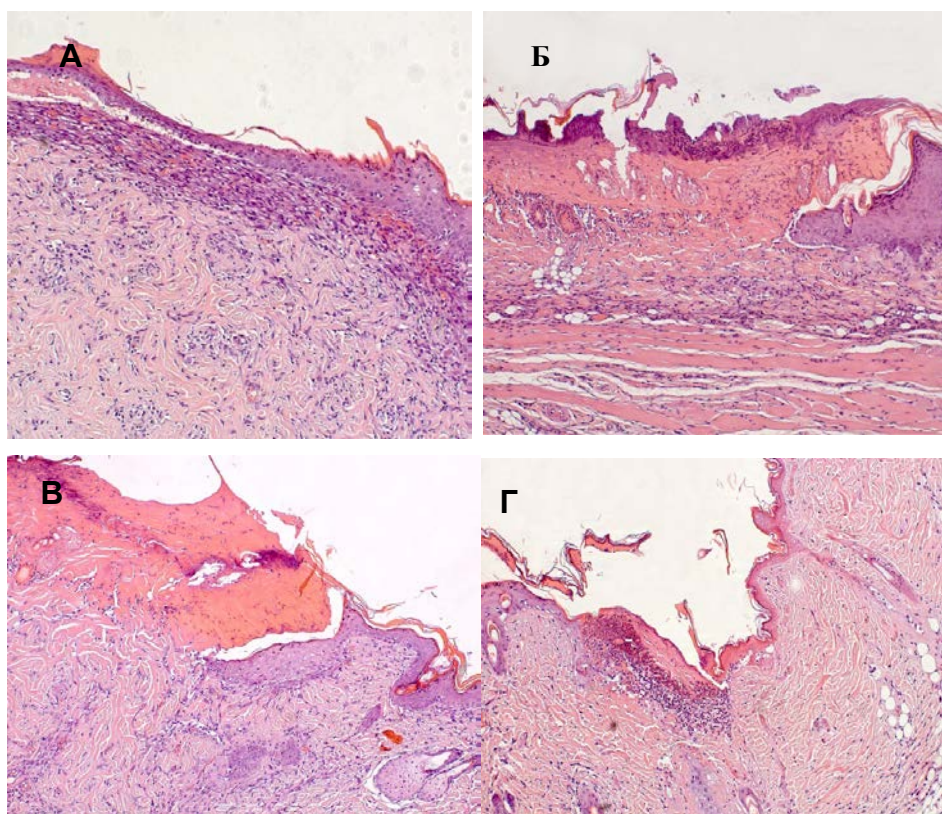


Рисунок 2 – Гистологические срезы биоптатов с места дефекта на 3 сутки после лечения с помощью раневых покрытий: А – коммерческий материал «ВоскоПран»; Б – гибридная мембрана П(ЗГБ/4ГБ)+БЦ; В – гибридная мембрана П(ЗГБ/4ГБ)+БЦ+актовегин; Г – гибридная мембрана П(ЗГБ/4ГБ)+БЦ+фибробласты. Окраска гематаксилин-эозином. Увеличение×100

Поверхность участка повреждения неровная, покрыта слоем некротических масс с остатками эпидермиса. В центре ожога волосяные фолликулы и сальные железы либо отсутствуют, либо представлены небольшими структурами с нарушенной структурой с далеко зашедшими некротическими изменениями. На границе с неповрежденными тканями определялась умеренно выраженная инфильтрация с преобладанием полиморфноядерных лейкоцитов. Признаки регенерации в краях ран отсутствовали.

Однотипную картину наблюдали у животных всех групп на 7-е сутки эксперимента (рис. 2). Раневая поверхность была покрыта неравномерной толщины струпом, под которым сохранялась область некроза, содержащая остатки погибших придатков кожи; местами покрыта эпидермисом. Волосяные фолликулы, придатки кожи в месте ожога не восстановлены. В эпидермисе в краях зоны ожога отмечены различного размера полости, что оценивается как гидропические изменения эпителия. Мелкие полостные образования выглядят оптически пустыми, крупные – содержат слабо эозинофильную жидкость. В дерме и подкожной клетчатке вокруг участка ожога имеет место умеренно выраженная инфильтрация плазматическими клетками, эозинофилами, лимфоцитами, макрофагами. Некротические массы отделены от сохранившихся тканей валом из сегментоядерных лейкоцитов. Отмечена положительная зависимость между выраженностью перифокальной воспалительной инфильтрации и глубиной некроза. В краях участков ожога эпидермис активно пролиферировал, утолщен с явлениями акантоза.

На 14-е сутки во всех группах наблюдали эпидермизацию, активность которой была выше у животных экспериментальных групп (рис. 3 В, Г).

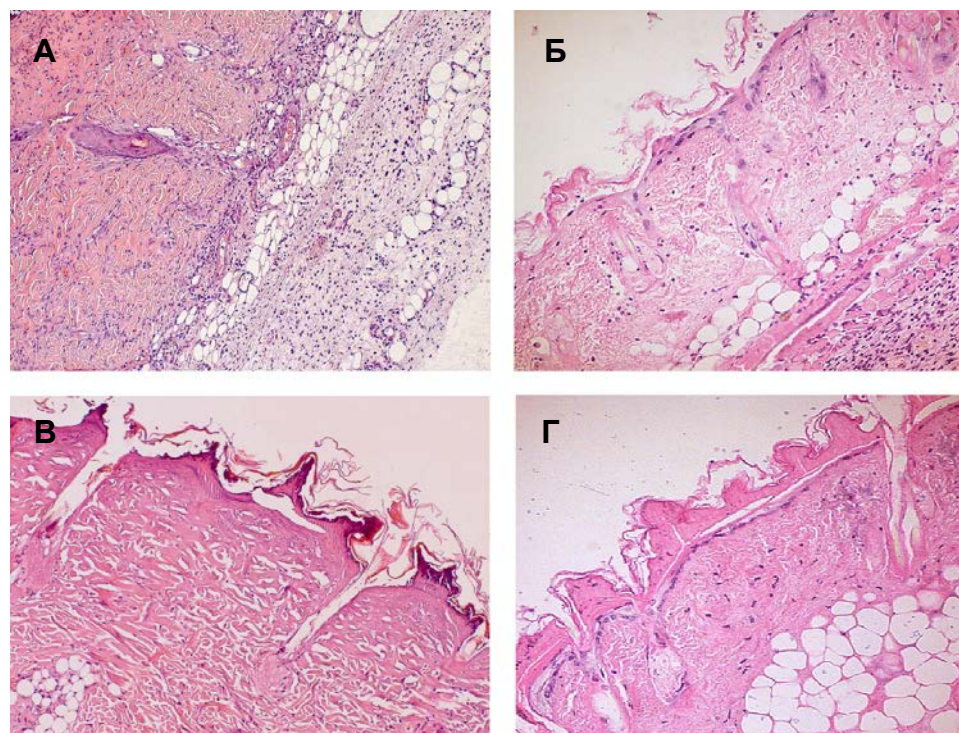


Рисунок 3 – Гистологические срезы биоптатов места дефекта на 14 сутки после лечения: А – коммерческий материал «ВоскоПран»; Б – гибридная мембрана П(3ГБ/4ГБ)+БЦ; В – гибридная мембрана П(3ГБ/4ГБ)+БЦ+актовегин; Г – гибридная мембрана П(3ГБ/4ГБ)+БЦ+фибробласты. Окраска гематаксилин-эозином. Увеличение×100

Отмечено врастание тонкого слоя вновь образованного эпидермиса под слой некротических масс, покрывающих рану. В группах под покрытиями с актовегином и фибробластами раневой дефект почти полностью был покрыт слоем эпидермиса. В краевой

зоне эпидермис образовал тонкие акантотические тяжи, из которых впоследствии формируются волосяные фолликулы. Процесс эпидермизации проходил без формирования грануляционной ткани. Подлежащая дерма содержала немногочисленные умеренно полнокровные артерии и расширенные вены с большим количеством эритроцитов. Во всех группах в краях раны под эпидермисом отмечена активная пролиферация фибробластов, которой сопутствовала появлению мелких кровеносных сосудов. У животных контрольной группы на четырнадцатые сутки зона омертвения была окаймлена более выраженным лейкоцитарным валом, который местами распространялся на подлежащую жировую клетчатку. Аналогичную картину, выраженную несколько менее активно, наблюдали и в группе животных под покрытием П(ЗГБ/4ГБ)/БЦ; зона омертвения была окаймлена более выраженным лейкоцитарным валом, который местами распространялся на подлежащую жировую клетчатку.

**Заключение.** Таким образом, показана высокая эффективность разработанных сконструированных гибридных систем на основе разрушаемых биополимеров и бактериальной целлюлозы в качестве биотехнологических дермальных эквивалентов.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛАСТИЧНЫХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ТРИАЦЕТИНА

**Н. Л. Ертилецкая, А. А. Шуилова**

*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск*

*E-mail: natalya.ertiletskaya@gmail.com*

**Ключевые слова:** биоупаковка, пленки, полигидроксиалканоаты, пластификатор, триацетин

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные разрушаемые линейные полиэфиры микробиологического происхождения. Наиболее охарактеризованным и распространенным среди ПГА является поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)). Однако пленки, получаемые из П(ЗГБ), получают жесткими и хрупкими, что является существенным недостатком для их использования в качестве упаковки [1, 2]. Для избавления от этого недостатка применяются различные подходы, одним из которых является добавление пластификаторов в раствор полимера, что позволяет улучшить свойства полимеров и изделий из них в результате инициации вторичной кристаллизации [3].

**Цель работы** – получить и исследовать серию образцов полимерных пленок с различным процентным содержанием пластификатора.

**Материалы и методы.** В качестве пластификатора был выбран триацетин (ТАГ) марки AcrosOrgainics (Германия). Полимерные пленки получали методом полива разогретого до 50°C 2 %-ного раствора П(ЗГБ) ( $M_n = 616$  кДа,  $D = 2,40$ ) в хлороформе на обезжиренную поверхность чашек Петри, предварительно добавив в него необходимый объем ТАГ. Исследован внешний вид полученных пленок, микроструктура, ДТА, физико-механические характеристики и свойства поверхности.

**Результаты.** В результате выполненной работы получены пять образцов пленок из 2% раствора П(ЗГБ), с включением ТАГ 7%, 14,5%, 29%, 43,5 % от массы полимера. Пленки не отличаются визуально, прозрачные, имеют гладкую поверхность.

По данным электронной микроскопии (Hitachi TM 3000) поверхностей полученных полимерных пленок, установлено, что в отличие от гладкой пленки П(ЗГБ), пленка с наибольшим содержанием ТАГ имеет более рыхлую, пористую, неоднородную структуру (рисунки).

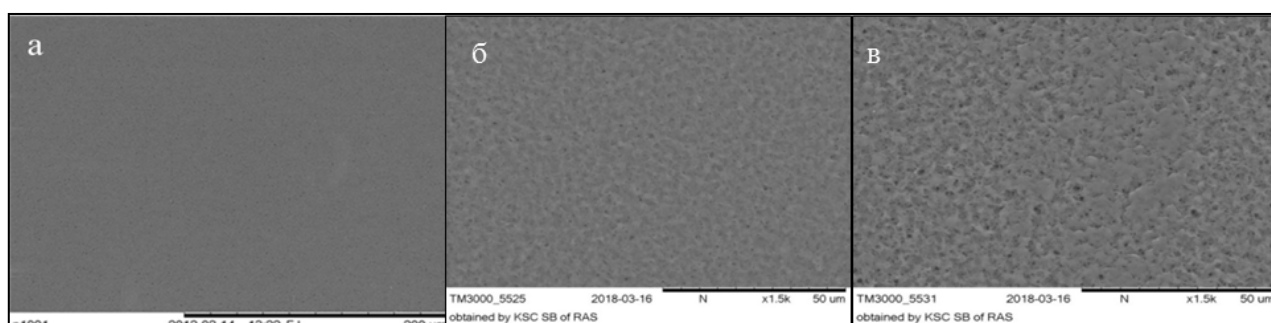


Рисунок – Микроструктура полученных образцов полимерных пленок: а – П(ЗГБ) 2%, б – П(ЗГБ) + 7% ТАГ, в – П(ЗГБ) + 43,5% ТАГ

В отличие от гидрофобной пленки П(ЗГБ), для образцов, полученных из полимера с включения ТАГ характерно падение значения краевого угла смачивания водой, что говорит об увеличении гидрофильности полученных пленок. При этом значения поверхностного натяжения дисперсионной фазы существенно не меняются при увеличении доли ТАГ в составе полимера и остаются приблизительно на одном уровне для всех образцов. Поверхностное натяжение полярной фазы понизилось с 8,4 до 3,3 при добавлении 7% ТАГ; далее это значение постепенно растет, достигая значения 7,2 при максимальном процентном содержании ТАГ.

Таблица 1 – Результаты исследования поверхностных свойств образцов полимера

Состав образца	Краевой угол смачивания, °	Поверхностное натяжение дисперсионной фазы, мН/м	Поверхностное натяжение полярной фазы, мН/м
2% П(ЗГБ)	89,80 ± 8,2	36,7 ± 0,9	1,4 ± 0,6
2% П(ЗГБ) + 7% ТАГ	80,7 ± 8,0	41,4 ± 1,6	3,3 ± 0,4
2% П(ЗГБ) + 14,5 % ТАГ	81,1 ± 7,2	40,3 ± 2,1	3,4 ± 0,5
2% П(ЗГБ) + 29 % ТАГ	75,6 ± 12,1	39,2 ± 1,2	5,6 ± 0,7
2 % П(ЗГБ) + 43,5 % ТАГ	71,0 ± 4,03	40,5 ± 0,8	7,2 ± 0,3

По результатам ДСК выявлено уменьшение температуры кристаллизации полимерной пленки при увеличении доли ТАГ в ее составе. За счет изменения температуры кристаллизации в результате добавления пластификатора происходит изменение физико-механических свойств полученных пленок, что согласуется с опубликованными данными [2].

Таблица 2 – Результаты ДСК образцов полимерных пленок

Состав образца	Температура кристаллизации, °С	Температура начала плавления, °С	Температура деградации, °С
2% П(ЗГБ)	113,71	170,99	295,06
2% П(ЗГБ) + 7% ТАГ	109,69	169,22	288,76
2% П(ЗГБ) + 14,5% ТАГ	107,7	166,73	269,22
2% П(ЗГБ) + 29% ТАГ	108,86	169,79	295,82
2% П(ЗГБ) + 43,5% ТАГ	94,52	167,84	295,91

Таблица 3 – Результаты физико-механических испытаний образцов полимерных пленок

Состав образцов:	Модуль Юнга, МПа	Предел прочности, МПа	Удлинение при разрыве, %
2% П(ЗГБ)	1016,04 ± 148,26	17,59 ± 2,18	2,89 ± 0,44
2% П(ЗГБ) + 7% ТАГ	1171,15 ± 40,66	20,03 ± 1,10	3,36 ± 0,84
2% П(ЗГБ) + 14,5% ТАГ	1061,54 ± 180,14	18,70 ± 1,89	4,39 ± 0,33
2% П(ЗГБ) + 29% ТАГ	617,53 ± 103,29	12,68 ± 0,48	11,78 ± 4,14
2% П(ЗГБ) + 43,5% ТАГ	515,55 ± 39,84	9,72 ± 0,52	28,13 ± 4,53

Физико-механические испытания полученных образцов полимерных пленок показали, что с повышением концентрации ТАГ в составе полимерной пленки наблюдается явное увеличение величины удлинения при разрыве с 2,89 до 28,13 %. Модуль Юнга и предел прочности уменьшаются с увеличением доли пластификатора в составе пленки.

**Заключение.** Экспериментально установлено, что при добавлении пластификатора триацетина в П(ЗГБ) на фоне снижения температуры плавления материала увеличиваются гидрофильность и эластичность получаемых пленок, что свидетельствует о возможности использования данных композитных пленок в качестве разрушаемой биоупаковки.

#### Литература

1. Baltieri R. C. Study of the influence of plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate) compounds/ R. C. Baltieri, I. Mei, H. Lucia, J. Bartoli. // *Macromolecular Symposia*. – WILEY-VCH Verlag, 2003. – Т. 197. – №. 1. – С. 33-44.
2. Chiellini E. *Environmentally compatible food packaging*. – Elsevier, 2008.
3. Волова Т. Г. В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины – Новосибирск: СО РАН, 2003.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПГА И ПОРООБРАЗОВАТЕЛЕЙ

Д.С. Малышева

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

*E-mail: malysheva.dasha.95@gmail.com*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, хлорид калия, мочевины, пленочные матриксы, пористость

Разработка и исследование пористых матриксов, которые могут обеспечивать клеточную адгезию способствуя пролиферации и дифференцировке культивируемых клеток является одной из ключевых задач тканевой инженерии. Идеальный матрикс должен обладать следующими свойствами: биосовместимостью, способностью разрушаться до простых соединений; пористостью; механической прочностью [1].

Для успешной адгезии и пролиферации клеток особое внимание уделяется свойствам поверхности клеточных носителей, геометрии, макро- и микропористости, что во многом зависит от химического состава материала и технологии получения изделия. Взаимосвязанная пористость обеспечивает миграцию и пролиферацию клеток, а также васкуляризацию клеточных носителей [2].

Перспективным материалом для создания таких матриксов являются полигидроксиалканоаты (ПГА). Эти полимеры биосовместимы и инертны по отношению к

животным тканям, способны разрушаться до безопасных продуктов CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O в процессе биологической деградации. Одним из известных представителей ПГА является полимер 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)), однако, получаемые пленочные матриксы из него являются гидрофобными, и это препятствует адгезии клеток. Введение в матрицу полимера порообразующих веществ и наполнителей с последующим вымыванием последних позволяет получать клеточные носители с измененными свойствами, включая формирование пористости, изменение структуры и свойств поверхности, что может стимулировать адгезию и пролиферацию клеток.

**Цель работы** – получение и исследование пористых матриксов на основе поли-3-гидроксибутирата с использованием порообразователей.

**Материалы и методы.** Использовали: поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)) – M<sub>n</sub>= 760 кДа, D 1,60 кДа, S<sub>x</sub>= 76 % , T<sub>п</sub>= 170 °С; хлорид калия – M<sub>n</sub>= 74,5 г/моль, плотностью – 1,989 г/см<sup>3</sup>, T<sub>п</sub>= 790 °С; мочевины CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> – M<sub>n</sub>= 96,09 г/моль, плотностью – 1,5 г/см<sup>3</sup>, T<sub>п</sub>= 58 °С. Пористые пленочные 2D матриксы были получены методом растворных технологий с использованием двух порообразователей (КСI и CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) техникой литья полимерного раствора с последующим испарением растворителя. К полимерным растворам П(ЗГБ) в хлороформе различной концентрации 2, 4, 6 и 8%, добавляли раствор КСИ или CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> в соотношении 1:1; который выливали на обезжиренную поверхность чашек Петри, далее высушили 48 ч и промывали полученные пленки дистиллированной водой до полного удаления порообразователей.

Суммарную пористость полученных пленочных матриксов находили по формуле [Masaeli E., 2012].

$$\text{Пористость (\%)} = \frac{\text{Плотность матрикса (г/см}^3\text{)}}{\text{Плотность материала (г/см}^3\text{)}} \cdot 100\%$$

Поли-3-гидроксибутират имеет плотность 1,243 г/см<sup>3</sup>

Физико-механические характеристики пленок исследованы с помощью универсальной разрывной машины Instron.

**Результаты.** Получена серия пористых матриксов в виде пленок на основе П(ЗГБ) после вымывания различных порообразователей (КСI и CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>). Суммарная пористость и физико-механические характеристики пленок представлены в табл. 1–2.

Таблица 1 – Суммарная пористость пленочных образцов

Образец	Плотность матрикса, г/см <sup>3</sup>	Пористость, %	Размер пор, мкм
П(ЗГБ)-2%	0,515	33	30-40
П(ЗГБ)+КСI- 2%	0,785	63	30-100
П(ЗГБ)+КСI- 4%	0,719	58	30-150
П(ЗГБ)+КСI- 6%	0,614	50	30-170
П(ЗГБ)+КСI- 8%	0,410	41	70-200
П(ЗГБ)+CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - 3%	0,843	68	20-80
П(ЗГБ)+CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - 4%	0,470	39	20-100

Наибольшей суммарной пористостью обладают пленочные матриксы, полученные из 2% раствора П(ЗГБ)+КСI и 3% раствора П(ЗГБ)+CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Установлено, что с увеличением

концентрации раствора, суммарная пористость пленок уменьшалась, а диаметр пор увеличивался, по всей видимости, в результате слипанием частиц порообразователя в полимерном растворе и их плохой дисперсией.

Установлено, что с появлением пористости происходит уменьшение Модуля Юнга и предела прочности на разрыв. Однако в целом введение порообразователей в растворы П(ЗГБ) позволяет получить пленки с удовлетворительными физико-механическими характеристиками (табл. 2).

Таблица 2 – Физико-механические характеристики пленочных образцов

Образец	Модуль Юнга, МПа	Предел прочности, МПа	Удлинение при разрыве, мм/мм
П(ЗГБ) - 2%	1741,89±18,68	28,88±3,84	1,18±0,12
П(ЗГБ)+KCL- 2%	1380,13±51,05	13,9±2,05	0,9±0,005
П(ЗГБ)+KCL- 4%	219,49±59,42	4,29±2,52	0,02±0,014
П(ЗГБ)+KCL- 6%	566,61±117,56	6,13±0,61	0,02±0,003
П(ЗГБ)+KCL- 8%	89,66±32,768	2,14±0,60	0,03±0,006
П(ЗГБ)+CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - 3%	1080,13±19,03	7,39±1,14	0,03±0,005
П(ЗГБ)+CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - 4%	780,10±29,1	5,12±1,50	0,02±0,007

**Заключение.** Получены пористые пленки из растворов П(ЗГБ) и двух порообразователей (KCl и CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) с удовлетворительными механическими характеристиками.

#### Литература

1. Волова, Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов. – Красноярск: СФУ, 2009. – Электрон. дан. (6 Мб)

2. Шумилова, А. А. Потенциал биоразрушаемых полигидроксиалканоатов в качестве костнопластических материалов: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.01.06 / Шумилова Анна Алексеевна. – Красноярск, 2015.

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ 3D-ФОРМОВАНИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

**К.А. Кистерский, А.В. Демиденко, С.И. Жестовская, Н.В. Тюменцев, Е.И. Шишацкая**

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

*E-mail: kisterski@yandex.ru*

**Ключевые слова:** биотехнология, медицина, травматология и ортопедия, регенеративная медицина, 3D-печать, биопринтинг

Современные изделия для реконструктивной травматологии и ортопедии производят из различных биоинертных и биоактивных материалов (1, 2). Перспективным биоразрушаемым материалом для регенерации костной ткани являются полигидроксиалканоаты (ПГА), свойства которых совмещают контролируемую биоразрушаемость, биосовместимость, а также направленную остеоиндукцию (3, 4). Это позволяет применять их в наиболее сложных технологиях, направленных на восстановление дефектов костных органов больших размеров и сложной формы.



**Цель работы:** получить филаменты и создать картридж из ПГА для FDM 3D-печати; получить и исследовать экспериментальные образцы “отпечатков” с КТ-снимков костных элементов человека.

**Материалы и методы.** Использованы два типа ПГА: поли-3-гидроксibuтират (П(ЗГБ)) и сополимер 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом (П(ЗГБ/ЗГВ)), из которых предварительно был получен гранулят и далее с применением экструдирования расплава получены филаменты как основа картриджа для аддитивной FDM технологии. Проведены конвертирование DICOM снимков в формат для работы в полигональных редакторах, моделирование и доработка выбранных элементов с использованием анонимной базы данных томографических снимков Красноярской краевой клинической больницы №1. 3D-модели элементов загружены в слайсеры Cura и Slic3r (программы для послойного разложения модели) и конвертированы в машинный код для 3D-принтера Hercules Strong 2015.

Полученные модели использованы для 3D-печати экспериментальных образцов, внутреннее наполнение которых было выполнено с использованием автоматических алгоритмов заполнения в программах Cura и Slic3r. Проведена модификация экструдированной головки 3D-принтера для печати с использованием филаментов из ПГА. Получены экспериментальные образцы 3D-принтерированных изделий и выполнено тестирование физико-механических свойств (ГОСТ 4651-2014 “Пластмассы. Метод испытания на сжатие”) с применением универсальной электромеханической разрывной машины Instron 3369 с видео-экстензометром; определены прочность на сжатие и разрыв, модуль Юнга. По результатам тестирования для последующей FDM печати выбран сополимер как наиболее подходящий по физико-механическим и температурным свойствам. Печатные полимерные образцы использованы в качестве подложек для культивирования фибробластов мыши NIH 3T3 с оценкой жизнеспособности и пролиферативной активности клеток.

**Результаты.** Полученные результаты исследования физико-механических свойств 3D-изделий представлены в таблице и на рис. 1-2.

Таблица – Результаты физико-механических испытаний (испытание на сжатие) 3D-печатных образцов из П(ЗГБ/ЗГВ)

№ образца	Высота образца, мм	Мах нагрузка, Н	Деформация при сжатии, %	Модуль Юнга, МПа	Напряжение при разрушении, МПа
1	50,00	2768,98	7,40	900,71	13,77
2	50,00	2786,58	6,96	870,92	14,13
3	50,00	2702,75	7,12	837,24	11,41
Среднее значение	50,00	2752,77	7,16	869,62	13,10
Стандартное отклонение		44,20	0,22	31,75	1,47

Проведено сравнение полученных показателей с данными работы (5) с учетом показателей предельной прочности изделий живой костной тканью. Предельная нагрузка для ткани большеберцовой кости человека составляет порядка 17 000 Н, тогда как максимальная нагрузка на экспериментальных 3D-образец из сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) составила 2 752,77 Н, что меньше почти в 6 раз.

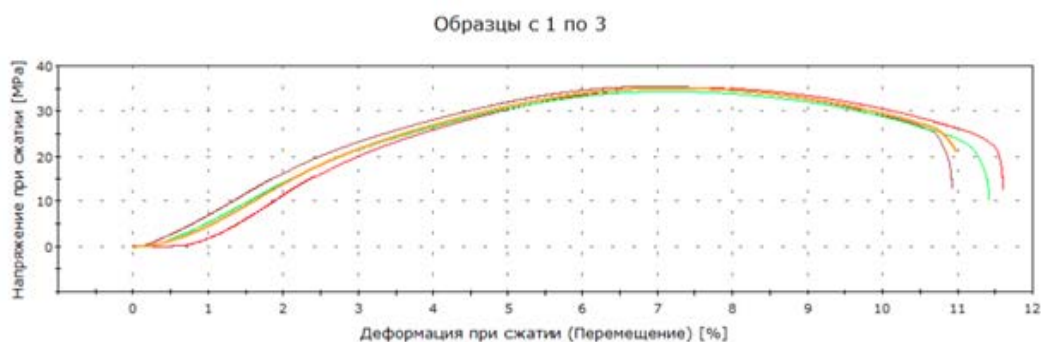


Рисунок 1 – Отношение деформации при сжатии к нагрузке на образец

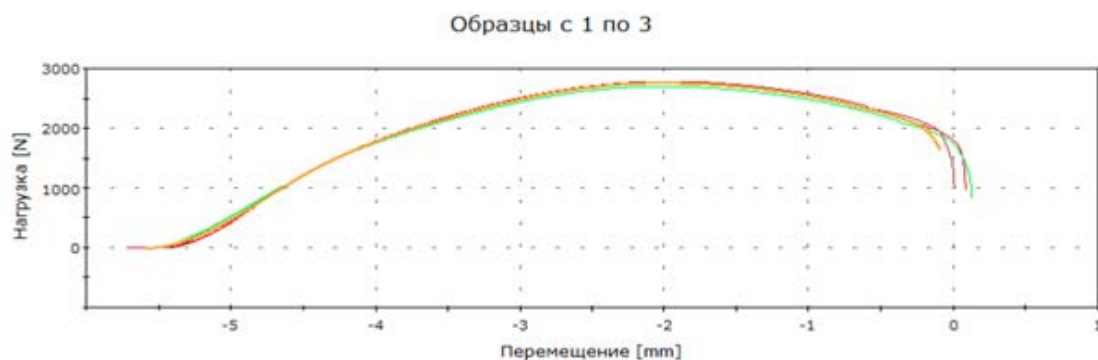


Рисунок 2 – Отношение нагрузки на образец к перемещению деформирующей головки прибора

По результатам тестирования прочностных свойств можно заключить, что достигнутые результаты позволяют использовать материал для получения 3D FDM форм для реконструкции плоских костей черепа и, возможно, мелких костей кисти руки. Однако для 3D-печати имплантатов, предназначенных для восстановления трубчатых костей, несущих осевую нагрузку, необходимы дальнейшие исследования, ориентированные на модификацию исходного полимерного материала, в том числе в результате создания композитов ПГА с керамиками.

Полимерные 3D-образцы обладали высокими адгезионными свойствами по отношению к фибробластам (рис. 3 а) и не проявили цитотоксического воздействия при прямом контакте клеток с поверхностью изделий. Количество жизнеспособных клеток в МТТ тесте на экспериментальных образцах в виде дисков и пластин было выше, чем на контрольном пластике культуральных планшетов (рис. 3 б).

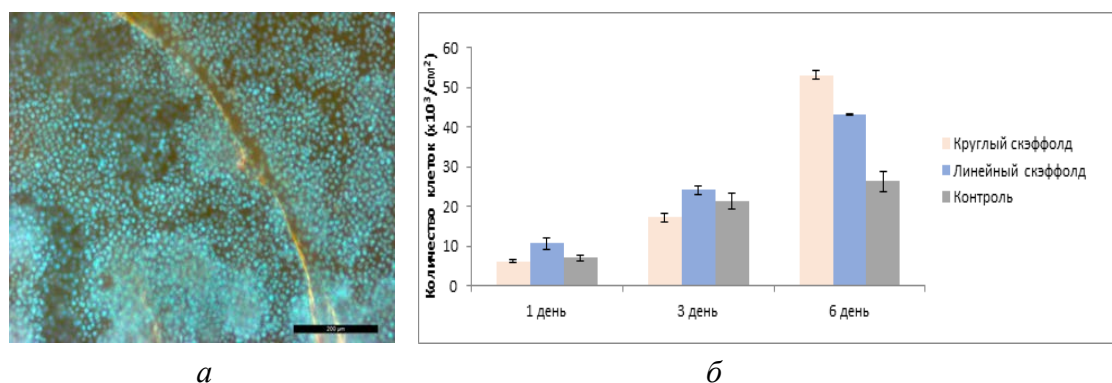


Рисунок 3 – Фибробласты мыши NIH 3T3, окрашенные DAPI, на 3D-печатном фрагменте толщиной 50 мкм; маркер 200 мкм (а); количество жизнеспособных клеток в МТТ тесте (б)

**Заключение.** Впервые создан картридж для 3D-печати из ПГА; разработана и реализована аддитивная технология получения прототипов персонафицированных костных биоимплантатов из полимеров класса полигидроксиалканоаты с использованием 3D-печати на основе метода FDM – Fused deposition modeling.

#### Литература

1. Карлов А. В., Шахов В. П. Аппараты внешней фиксации. Теория, практика и перспективы использования метода в травматологии и ортопедии // Сибирский мед. журн. – 2001. – №. 2. – С. 76-82.
2. Бурьянов А. А., Корж Н. А., Ошкадеров С. П. Металлические материалы для имплантатов ортопедического и травматологического назначения // Ортопед., травматол. – 2008. – №. 3. – С. 5-10.
3. Agrawal S. M. Reconstructing the human body using biomaterials // Jom. – 1998. – Т. 50. – №. 1. – С. 31-35.
4. Шишацкая Е. И. Биотехнология полигидроксиалканоатов: научные основы медико-биологического применения: дис.... докт. биол. наук: 03.00. 23 // Красноярск, – 2009. – 259 с. – 2009.
5. Rho J. Y., Kuhn-Spearing L., Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone // Medical engineering & physics. – 1998. – Т. 20. – №. 2. – С. 92-102.

## ПОЛУЧЕНИЕ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ МЕТОДАМИ ХОЛОДНОГО ПРЕССОВАНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ПЛАВЛЕНИЕМ

К.А. Зубакина

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

E-mail: Svetlana.Kristina0326@mail.ru

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, холодное прессование, плавление, костные имплантаты

Увеличение реконструктивных операций в ортопедии из-за травм, опухоли, деформаций костной ткани требует получения и исследования новых материалов для костных имплантатов. Среди исследуемых материалов, полигидроксиалканоаты (ПГА)-полиэфиры гидроксикарбоновых кислот, благодаря своим свойствам (биосовместимость,

биоразрушаемость, термопластичность) являются особенно перспективными. Однако, процессинг ПГА такими методами, как холодное прессование и плавление требует дальнейших исследований [1–2].

**Цель работы** – получение и исследование пластин из ПГА с помощью холодного прессования с последующим плавлением.

**Материалы и методы.** В качестве материалов исследования были взяты гомополимер поли-3-гидроксibuтират, основными физико-химическими свойствами которого являются: средневесовая молекулярная масса  $723 \pm 6,0$  кДа, температура плавления  $197,7$  °С; кристалличность  $76 \pm 1,2$  %, и сополимер поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат с включением 3-гидроксивалерата 17 мол. % и молекулярной массой  $300 \pm 4,7$  кДа; температурой плавления  $169,0 \pm 0,5$ ; кристалличность  $58 \pm 1,0$  %.

Измельчение полимерных образцов проводили с помощью ультрацентрифужной мельницы Retsch ZM-200. Полученные порошки фракционировали на просеивающей машине Retsch AT-200, насыпную плотность порошков исследовали с помощью тестера плотности утряски Pharma Test (PT-TD200) и угла естественного откоса. Полимерные пластины были получены методом холодного прессования на автоматизированном прессе Carver Auto Pellet из фракций разного размера, которые далее подвергались плавлению в тефлоновой форме в сушильном шкафу при температуре от  $160$  до  $175$ °С в зависимости от состава полимера. Исследованы физико-механические характеристики полимерных пластинс применением универсальной разрывной машины Instron.

**Результаты.** Измерение фракционного состава порошков полимера показало наличие в них нескольких фракций частиц различного размера: фракция 1 – 100 мкм; 2 – 300 мкм; 3 – 500 мкм; 4 – 800 мкм. Фракционный состав оказывает определенное влияние на степень сыпучести порошков, следовательно, на качественные характеристики прессованных форм. Результаты исследования характеристик порошков П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) (насыпной объем до и после уплотнения, насыпная плотность, плотность утряски, угол естественного откоса) представлены в табл.1 (отобраны фракции размером 300 и 800 мкм).

Таблица 1 – Характеристики фракционного состава порошков

Фракция	Размеры частиц, мкм	Насыпной объем до уплотнения $V_0$ мл	Насыпной объем после уплотнения, $V_0$ мл	Насыпная плотность, г/мл	Плотность утряски, %	Угол естественного откоса, %
П(ЗГБ)/ЗГВ-1	300	$50 \pm 0,02$	$29 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,01$	$44,1 \pm 0,01$	$50,4 \pm 0,01$
П(ЗГБ)/ЗГВ-2	800	$50 \pm 0,01$	$32 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,01$	$38,8 \pm 0,01$	$48,2 \pm 0,03$
П(ЗГБ)-1	300	$50 \pm 0,01$	$26 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,01$	$47,3 \pm 0,01$	$52,3 \pm 0,02$
П(ЗГБ)-2	800	$50 \pm 0,0$	$30 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$44,1 \pm 0,01$	$46,6 \pm 0,01$

Плотность утряски фракций 300 мкм у П(ЗГБ) оказалась выше, при этом показано, что чем выше насыпная плотность порошка, тем хуже его формуемость, но лучше прессуемость. Показано, что величина сил сцепления и трения между частицами в порошке выше у фракции с размером частиц 300 мкм, так как данные показатели связаны с углом естественного откоса.

Охарактеризованные порошки П(ЗГБ) использованы для получения 3D-имплантатов методом прямого холодного прессования шириной 20 мм и длиной 40 мм. Прессовки имели массу  $1 \pm 0,0015$  г. и были получены из порошков нескольких фракций (100, 300, 500 и 800 мкм. Второй тип имплантатов был в виде пластин, полученных из смеси двух фракций порошков (100 и 300 мкм в процентном соотношении 70/30, 50/50). Пластины имели более гладкую и ровную поверхность по сравнению с пластинами из фракций 500 и 800 мкм.

Установлено, что самыми прочными оказались пластины, полученные с фракций 100 мкм, у которых модуль Юнга  $2813,55 \pm 259,45$  МПа. Для образцов, изготовленных из фракций 500 и 800 мкм, характерно падение модуля упругости в результате ослабления сил сцепления и увеличения расстояния между частицами.

Таблица 2 – Физико-механические характеристики 3D-пластин

Пластины из фракций	Модуль Юнга, МПа	Нагрузка при разрушении, Н
100 мкм	$2813 \pm 259$	$11,2 \pm 0,5$
300 мкм	$2203 \pm 102$	$9,2 \pm 0,8$
500 мкм	$922 \pm 60$	$4,1 \pm 0,3$
800 мкм	$659 \pm 7$	$3,8 \pm 0,5$
70%-100 мкм 30%-300 мкм	$2209 \pm 674$	$9,4 \pm 4,4$
50%-100 мкм 50%-300 мкм	$2444 \pm 440$	$11,6 \pm 0,4$

На рисунке даны фото полученных 3D-имплантатов из П(ЗГБ/ЗГВ). Образцы из сополимера в отличие от полученных из П(ЗГБ), сохраняли цвет исходных порошков, а полученные из гомополимера в результате окисления имели желтоватый оттенок. Были получены пластины размером 37 мм в длину и 7 мм в ширину из фракции 300 мкм, которые имели более высокие характеристики.

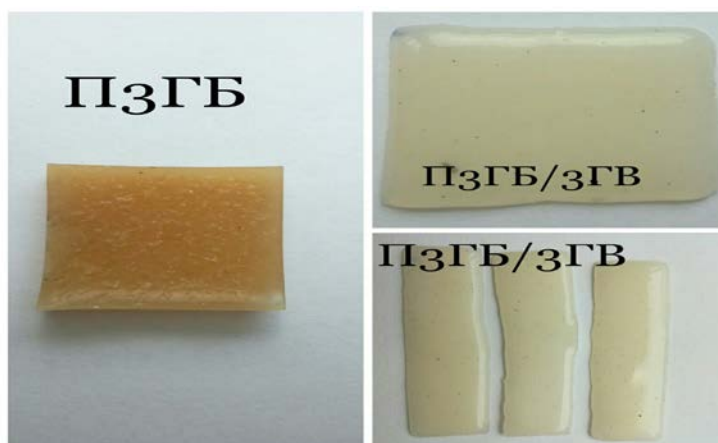


Рисунок – Фото 3D-полимерных изделий

**Заключение.** Методом холодного прессования с последующим плавлением получена серия 3D-имплантатов в виде пластин, механические характеристики которых зависели от типа полимера и размерной фракции исходных порошков. Самые прочные пластины были получены из П(ЗГБ) холодным прессованием из фракции с размером частиц 100 мкм, которые имели модуль Юнга  $2813,55 \pm 259,459$  МПа. Для применения метода плавления более пригоден сополимер П(ЗГБ/ЗГВ).

### Литература

1. Волова, Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск : СО РАН, 2003. с.-105-163
2. Шумилова А., Материалы для восстановления костной ткани / А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая // Институт биофизики СО РАН, 2014, с. – 210-214.

## ПОЛУЧЕНИЕ ПОРИСТЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПГА МЕТОДОМ ФАЗОВОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

А.А. Калинин

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

*E-mail: anya.kalinkina.97@mail.ru*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, тетрагидрофуран, гели, лиофилизация, трехмерные структуры

Актуальной задачей тканевой инженерии является разработка и создание трехмерных структур (скаффолдов) в качестве каркасов для культивирования клеток на основе биоразрушаемых полимерных материалов. Одним из перспективных способов получения пористых полимерных скаффолдов является получение гелей с последующей лиофилизацией методами термического индуцированного фазового разделения (TIPS) и методом разделения фаз (NIPS) с применением осадителей.

Перспективным материалом для этих целей являются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры гидроксипроизводных алкановых кислот, синтезируемые микроорганизмами.

**Цель работы** – получение и исследование пористых матриксов из ПГА методом разделения фаз.

**Материалы и методы.** В качестве материалов исследования были выбраны: гомополимер гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)) ( $M_n = 723 \pm 6,0$  кДа;  $T_{пл} = 197,7$  °С;  $C_x = 76 \pm 1,2$  % и сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислоты 89,9-10,1 П(ЗГБ/ЗГВ) ( $M_n = 300 \pm 4,7$  кДа;  $T_{пл} = 169,0 \pm 0,5$ ;  $C_x = 58 \pm 1,0$  %. Исследована растворимость ПГА образцов в различных растворителях: хлороформе, дихлорметане, 1,4-диоксане. Гели были получены комбинацией методов TIPS и NIPS с использованием в качестве осадителя тетрагидрофурана (ТГФ). К 3% полимерному раствору П(ЗГБ) (хлороформ-растворитель) добавляли тетрагидрофуран в соотношениях 30/70, 40/60, 43/57, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20. Затем фиксировали время образования гелей в зависимости от концентрации растворов и температуры: -23, +7, +24°С, +37 °С. Полученные гели выдерживали в этиловом спирте и дистиллированной воде, в течение 2 дней, и затем лиофилизировали в течение 24 ч (0,04 mbar, - 50 °С). Исследовали микроструктуру и пористость полученных трехмерных матриксов.

**Результаты.** Предварительно была исследована растворимость П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) в хлороформе, дихлорметане или 1,4-диоксане при разных концентрациях полимерных растворов: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7%. Для формирования гелей выбраны 3% растворы П(ЗГБ) в хлороформе. Образование гелей зависело от концентрации раствора и соотношения раствора полимера с хлороформом и тетрагидрофураном. Рис. 1 иллюстрирует процесс образования гелей из растворов с разным соотношением растворителя и осадителя.

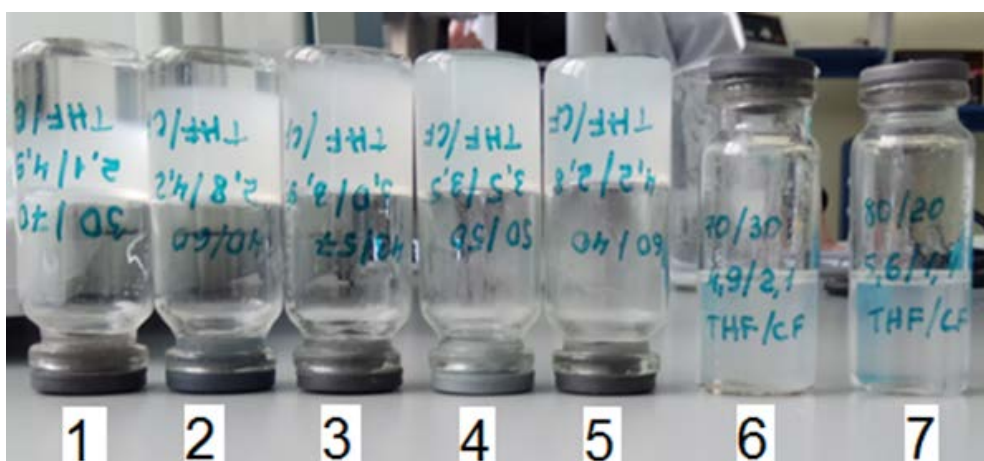


Рисунок 1 – Образование гелей соотношение растворителя и осадителя: 1 – 30/70, 2 – 40/60, 3 – 43/57, 4 – 50/50, 5 – 60/40, 6 – 70/30, 7 – 80/20

Гели 30/70, 40/60, 43/57 при комнатной температуре застыли не полностью. Формирование гелей из раствора с соотношением компонентов 80/20 не наблюдали. При соотношении 50/50 происходило образование геля через 24 минуты; при 60/40 – через 15 минут, при 70/30 – через 18 минут при комнатной температуре.

При изменении температуры -23 гели формировались за 6 мин независимо от концентрации раствора; при +5 гелеобразование отмечено в течение 10 мин и также вне зависимости от концентрации. При повышении температуры образование гелей не наблюдали.

После образования гелей, из них были выбраны гели с оптимальным соотношением для последующей лиофилизации.

Полученные пористые 3D-матрицы иллюстрируют рис. 2 и 3.

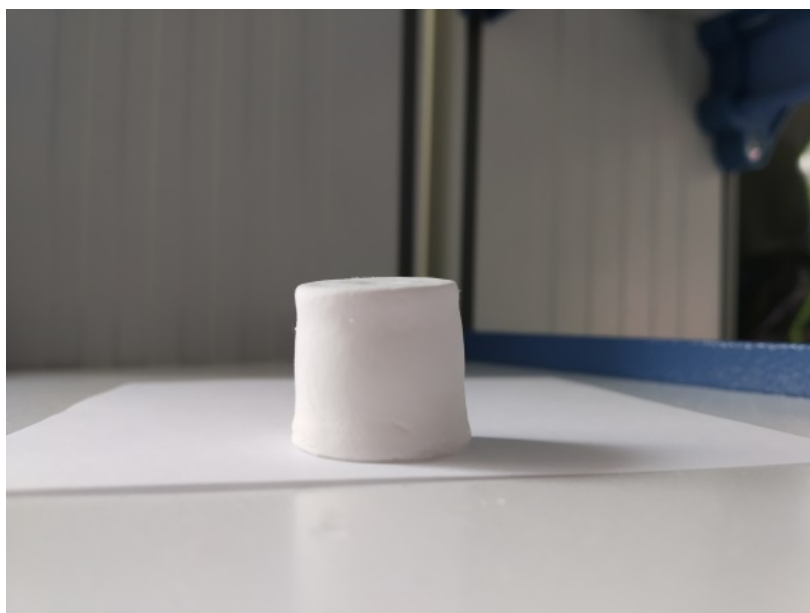


Рисунок 2 – Фото 3D-пористого матрикса

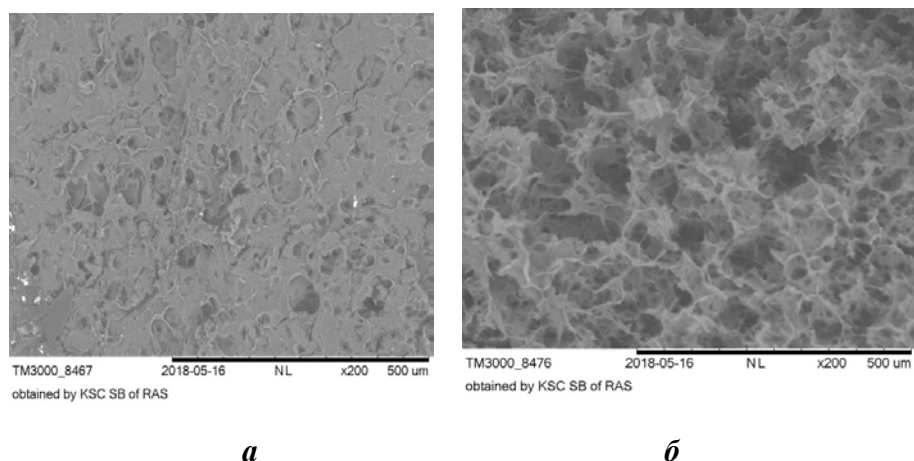


Рисунок 3 – РЭМ снимки пористого 3D-матрикса: а – внутренняя структура, б – структура поверхности

**Заключение.** Методом фазового разделения с использованием двух типов разрушаемых полигидроксиалканоатов – гомополимера гидроксимасляной кислоты П(ЗГБ) и сополимера 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислоты 89,9-10,1 П(ЗГБ/ЗГВ), получены пористые 3D-матрикса, перспективные для клеточных технологий.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПГА

А.Е. Мурзова

*Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Свободный 79б, Россия*

*E-mail: Murzova-anya@mail.ru*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, хитозан, гексафторизопропиловый спирт, композитные пленки

**Введение.** На сегодняшний день возрастает интерес к природным полимерам и способам использования их в медицине. Особое место занимают полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот и их композиты с другими натуральными полимерами, такими как хитозан. Хитозан – продукт деацетилирования хитина, выделяемый из наружного скелета ракообразных. Смешивание гидрофильного биополимера (хитозана) с гидрофобным полиэфиром (поли-3-гидроксibuтиратом) – это простой и эффективный способ получения полимерных материалов с желаемыми свойствами.

**Цель работы** – получение и исследование свойства композитных пленок на основе разрушаемого поли-3-гидроксibuтирата (П(ЗГБ)) и хитозана.

**Материалы и методы.** Образец П(ЗГБ) имел следующие свойства: средневесовая молекулярная масса 723 кДа, полидисперсность 1,66;  $T_{пл}$  – 177,1 °С; кристалличность 76%; и хитозан (М.м 500 кДа, СД 80%), Китай. Пленки получали методом литья растворов на обезжиренную поверхность чашек Петри. В качестве общего растворителя для П(ЗГБ) и хитозана использовали ГФИПС (1,1,1,3,3,3–гексафторизопропиловый спирт). Получали 1% и



3% растворы при соотношении П(ЗГБ)/хитозан как 1:0,5 и 1:0,25. Полученные композитные пленки высушивали в беспылевом боксе-ламинаре «Labconco» (США) при комнатной температуре в течение нескольких суток. Исследовали свойства и микроструктуру поверхности, физико-механические характеристики. Способность полученных композитных матриц поддерживать рост и адгезию клеток изучена *in vitro* в культуре мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (ММСК-КМ), выделенных из бедренной кости крыс.

**Результаты.** Получена серия композитных пленок на основе смесей П(ЗГБ) и хитозана в различных соотношениях. Визуально поверхность композитных пленок из П(ЗГБ)/хитозан отличалась от пленок из чистого П(ЗГБ). Композитные пленки имели неоднородную поверхность из-за «хлопьев» хитозана, при этом структура пленок была плотной без видимых пор, что доказано электронной микроскопией (рис. 1).

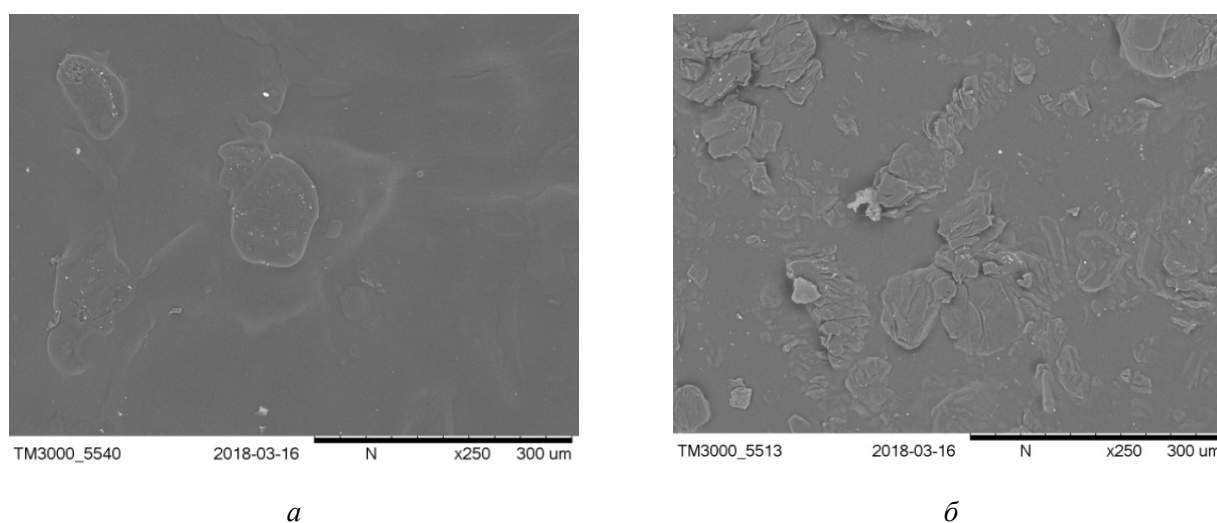


Рисунок 1 – РЭМ – снимки поверхности пленки: а – П(ЗГБ)/хитозан 3% (1:0,5); б – хитозан/ГФИПС 1%

Величины краевых углов смачивания водой поверхности композитных пленок были достоверно ниже ( $74,9^\circ \pm 6,4^\circ$ ;  $53,4^\circ \pm 10,9^\circ$ ) по сравнению с пленкой из П(ЗГБ) –  $88,9^\circ \pm 4^\circ$ . Установлено, что включение хитозана приводит к снижению гидрофобных свойств пленок из этого полимера и увеличению гидрофильных характеристик поверхности у композитных пленок (табл. 1).

Результаты исследования физико-механических свойств смесей представлены в табл. 2, из которой следует, что прочность композитных пленок, полученных из 1% раствора, к по результатам замера модуля Юнга, предела прочности и удлинения при разрыве на в отличие от пленок П(ЗГБ) снижается с включением хитозана значительно, соответственно, в 6, 16 и 3 раза. Однако при увеличении концентрации раствора до 3% отмечено менее выраженное падение прочностных характеристик. Температуры плавления и термической деградации для композитных пленок с включением 25% хитозана имели несколько сниженные значения ( $T_{пл}=143,8^\circ\text{C}$ ,  $T_{дегр}=249,7^\circ\text{C}$ ) относительно пленки из П(ЗГБ) ( $T_{пл}=177,1^\circ\text{C}$ ,  $T_{дегр}=287,1^\circ\text{C}$ ).

Адгезивные свойства композитных пленок исследованы в культуре ММСК-КМ крыс. По данным МТТ-теста на 3-е и 7-е сутки, наибольшее значение оптической плотности (показатель количества жизнеспособных клеток) зарегистрировано для пленок из чистого хитозана и композитной пленки (1:0,5), в отличие от пленок из гомополимера (рис. 2). Следовательно, наполнение полимера хитозаном повышает его биосовместимость по отношению к исследованным клеткам.

Таблица 1 – Свойства поверхности пленочных матриц из смеси ПГА/хитозан

Состав	Краевой угол (вода), град	Поверхностная энергия, мН/м	Дисперсная составляющая мН/м	Полярная составляющая, мН/м
П(ЗГБ) 1%	88,9 ± 4	52,2 ± 1,17	43,5 ± 0,83	8,7 ± 0,34
П(ЗГБ)/ХИТОЗАН/ГФИПС 1% (1:0,5)	74,9 ± 6,4	44,5 ± 1,06	38,4 ± 0,68	6,1 ± 0,38
П(ЗГБ)/ХИТОЗАН/ГФИПС 1% (1:0,25)	53,4 ± 10,95	55,6 ± 1,61	38,5 ± 0,61	17,1 ± 1,01
П(ЗГБ)/ХИТОЗАН/ГФИПС 3% (1:0,5)	71,6 ± 5,4	47,6 ± 1,5	40,7 ± 1,09	6,9 ± 0,41

Таблица 2 – Физико-механические характеристики пленочных матриц

Образец	Модуль Юнга, МПа	Предел прочности, МПа	Удлинение при разрыве, %	T <sub>пл</sub> , °С	T <sub>дегр</sub> , °С
П(ЗГБ) 1%	1952,4 ± 360,1	18,1 ± 1,2	1,4 ± 0,6	177,1	287,1
П(ЗГБ)/ХИТОЗАН/ГФИПС 1% (1:0,5)	304,8±26,2	1,58±0,34	0,68±0,02	169,5	285,3
П(ЗГБ)/ХИТОЗАН/ГФИПС 1% (1:0,25)	790,1±319,6	0,66±0,08	0,71±0,54	143,8	249,7
П(ЗГБ)/ХИТОЗАН+ГФИПС 3% (1:0,5)	1427,3±111,2	15,20±4,2	1,22±0,06	171,5	284,2

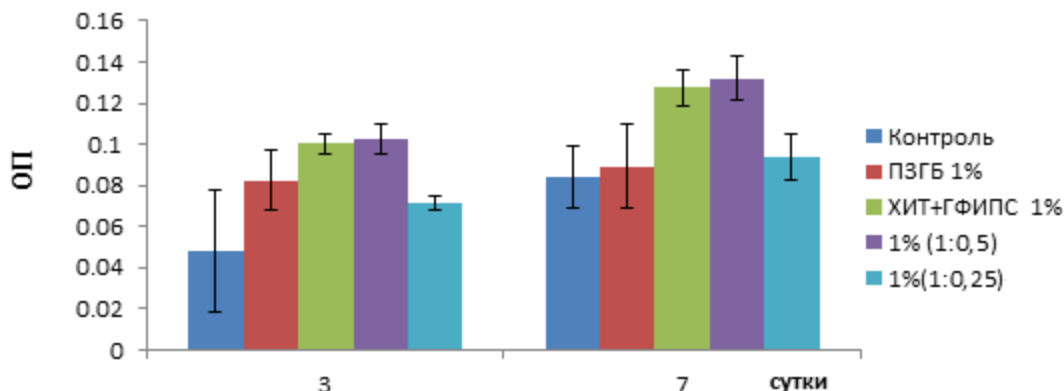


Рисунок 2 – МТТ-тест. Количество жизнеспособных клеток на композитных пленках, изготовленных из П(ЗГБ) и хитозана

**Заключение.** Получены композитные пленки на основе П(ЗГБ) и хитозана и установлено, что включение хитозана приводит к снижению механических свойств композитных пленок, однако увеличение гидрофильности поверхности обеспечивает более высокую адгезию культивируемых клеток.

#### Литература

1. Коновалова М. В. Получение и исследование противоспаечных барьерных материалов на основе биополимеров пектина и хитозана. диссертация канд. биолог. наук : 03.01.06, 2017, С. 24
2. Волова, Т. Г., Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Севастьянов В.И., Шишацкая. Е. И. Научное издание. Издательство СО РАН, 2003, С. 327.

## РАЗРАБОТКА ПЕРФУЗИОННОЙ КУЛЬТИВАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДОВ

Д. Д. Николаев

Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск

E-mail: dan4ik.1@mail.ru

**Ключевые слова:** перфузионная культивационная система, тканеинженерные сосуды, электростатическое формование, полимерные трубки П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ)

По данным ВОЗ ишемическая болезнь сердца является основной причиной смерти у мужчин и женщин во всем мире [1]. Методы хирургического лечения окклюзий коронарных артерий на сегодня – это аорто-коронарное шунтирование и транслюминальная ангиопластика, которые приносят хорошие, но не самые лучшие результаты. При выраженном поражении коронарных сосудов единственным выходом является пересадка сердца, со всеми техническими, этическими и экономическими сложностями, наибольшей из которых является дефицит донорских органов.

Разработка биоинженерных сосудов является перспективным решением проблем кровоснабжения сердца. Используя подход, объединяющий клеточную и молекулярную биологию, технологии инжиниринга, возможно получение аналогов коронарных сосудов, в том числе малого диаметра. В качестве конструкций, несущих клетки, используют каркасы из не разрушаемых и разрушаемых материалов. На сегодняшний день полигидроксиалканоаты ПГА являются потенциально идеальными материалами для биоинженерии сердца и сосудов [2, 3].

**Цель работы** – создание системы *in vitro* для тканеинженерных аналогов сосудов на основе разрушаемых ПГА.

**Результаты.** Нетканые полимерные трубки в качестве модели сосудов получены методом электростатического формования (ЭСФ) растворов ПГА двух типов: гомополимера П(ЗГБ) и сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) на автоматической установке «Nanon 01A» (Япония). Пористые нетканые трубки имели диаметр 3,2 мм и длину 40 мм.

На основе анализа литературных данных [4, 5] разработана экспериментальная герметичная система для культивирования клеток с пульсирующей подачей среды. Система включает емкости (ТРР, Швейцария) с переходниками, коннекторы, резиновые инъекционные узлы, трубки из поливинилхлорида в качестве шаблона (инфузионные системы “SF Medical Products GmbH, Germany” (рис. 1)).

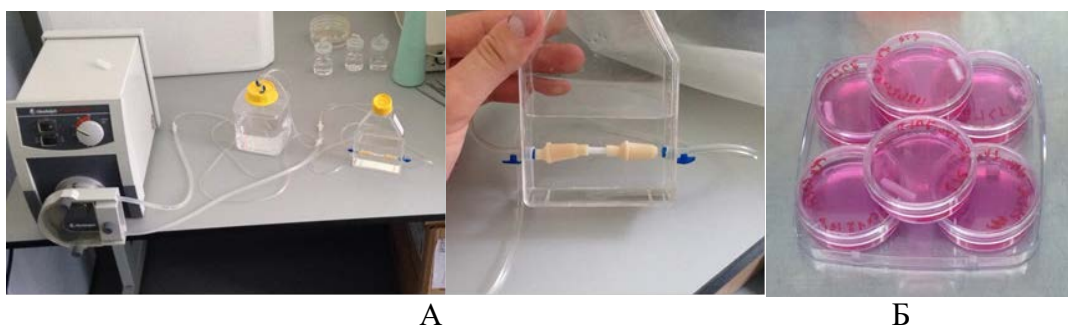


Рисунок 1 – А – прототип перфузионной культивационной системы, сконструированной с использованием перистальтического насоса; Б – тестирование ЭСФ изделий из ПГА

Проведена первичная оценка герметичности системы на дистиллированной воде, а также неполной культуральной среде в асептических условиях и гумидной атмосфере.

Достигнуты удовлетворительные результаты по герметичности и гидродинамическим параметрам с сохранением стерильности среды длительное время. Опытным путем подобрана скорость подачи среды в системы с использованием насоса (Heidolph Pumpdrive 5001) – 40 об./мин. Это позволило провести серию экспериментов с клетками, культивируемыми на поверхности фрагментов нетканых полимерных трубок.

Проведена оценка биосовместимости и способности поддерживать адгезию и пролиферацию клеток (использована культура фибробластов мыши линии NIH 3T3) на поверхности нетканых трубок в перфузионной системе. Полученные нетканые трубки засеивали фибробластами; клетки вносили из расчета 10 тыс. клеток/мл. Проводили инкубацию фибробластов мыши на поверхности полученных трубок в течение 7 суток в гумидной среде. Результаты оценивали микроскопически при окрашивании клеток флуоресцентным красителем DAPI (маркер ядерной ДНК). Клетки фиксировали 4% формалином и окрашивали. Фрагменты конструкции микроскопировали “LEICA DM6000B” (рис. 2).

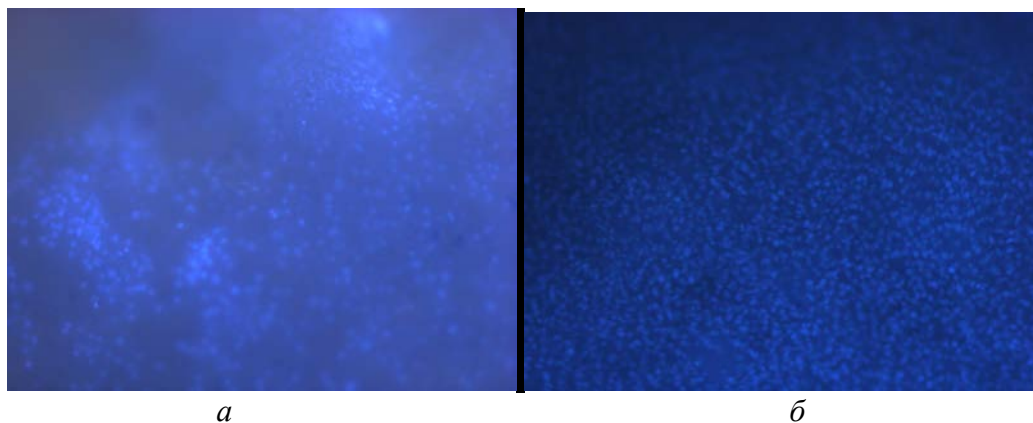


Рисунок 2 – Микроскопическая картина морфологии окрашенных фибробластов, культивируемых: *a* – на полимерной трубке из П(ЗГБ); *б* – на полимерной трубке из сополимера П(ЗГБ/ЗГВ)

Более активная адгезия и пролиферация фибробластов по результатам микроскопии характерна для сополимерных трубок

**Заключение.** В результате выполненных исследований получены нетканые трубки в качестве сосудистых протезов. Создана модель перфузионной культивационной системы и тканеинженерных каркасов из ПГА двух составов для биоинженерии сосудов. Результаты оценки функциональных характеристик перфузионной системе с трубками, засеянными культурой фибробластов, показали ее пригодность для пассивации клетками поверхности разработанных полимерных изделий и получения тканеинженерных прототипов сосудов.

### Литература

1. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations Judith A. Finegold, Perviz Asaria, Darrel P. Francis.
2. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. Larry L. Hench and Julian R. Jones. Woodhead Publishing Limited. 2005. 304 стр. ISBN 13: 978-1-85573-737-2.
3. Шишацкая Е.И., Жила Н.О., Николаева Е.Д., Сырвачева Д.А., Сински Э.Дж. Синтез и исследование сополимеров 3-гидроксibuтирата/4-гидроксibuктирата // Перспективные материалы. – 2013. – Т.3. – С.20-26.
4. Frédéric Couet and Diego Mantovani. A New Bioreactor Adapts to Materials State and Builds a Growth Model for Vascular Tissue Engineering. Artif Organs, Vol. 36, No. 4, 2012.
5. Peter S. McFetridge, Koki Abe, Michel Horrocks, Julian B. Chaudhuri. Vascular Tissue Engineering: Bioreactor Design Considerations for Extended Culture of Primary Human Vascular Smooth Muscle Cells.

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПЛОМБИРОВОЧНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ПГА

А.А. Федченко, А.А. Шумилова

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79*

*E-mail: fedchenko24@mail.ru*

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, сополимер 3-гидроксибутират/3-гидроксивалерат, гранулы, PRP-плазма, пористость

В настоящее время остро востребованы костно-пластические материалы для ортопедии и стоматологии. Такие материалы должны обладать, помимо биосовместимости, необходимой пористостью, биоразрушаемостью, способностью эффективно заполнять костные дефекты. Среди применяемых материалов – фосфаты кальция, биокерамика, коллаген и др. Перспективными признаны полимеры микробиологического происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА). Эти полимеры обладают достаточно высокой прочностью, термопластичностью, а также высокой степенью биосовместимости.

**Цель работы** – получить и исследовать в культуре клеток гранулы на основе ПГА различного состава, в том числе в комбинации с полилактидом (ПМК) и PRP плазмой.

**Материалы и методы.** В работе использованы: гомогенный полимер 3-гидроксимасляной кислоты П(ЗГБ) –  $M_v$  (723 кДа),  $T_{пл}$  179,7°C, полидисперсность 1,66; двухкомпонентный сополимер 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата П(ЗГБ/ЗГВ) с включением мономеров 3-гидроксивалерата 17 мол.%  $M_v$  300 кДа,  $T_{пл}$  169°C, ПД (3,26) и полилактид (ПМК). Для исследования были получены препараты PRP (Platelet Rich Plasma – обогащенная тромбоцитами плазма крови, жидкая форма препарата или суспензия). Полимерные гранулы получали техникой осаждения полимера из раствора. Раствор полимера концентрацией 10% нагревали на водяной бане при 45 °C до получения однородной вязкой жидкости. Раствор капельно дозировали на подложки, установленные на шейкере и заполненные порообразующим веществом (сахароза). Полученные гранулы помещали в осадительную ванну с гексаном, а затем промывали дистиллированной водой для удаления порообразующего вещества. Гранулы собирали и сушили в течение 24 ч в ламинарном шкафу.

Исследовали свойства гранул, включая размер, влагопоглощение и суммарную пористость. Биосовместимость оценивали в культуре МСК, выделенных из костного мозга крыс. Перед засевом клетками гранулы инкубировали в плазме в течение двух часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста и окрашивания красителем Life/Dead.

**Результаты.** Получены полимерные гранулы из П(ЗГБ), П(ЗГБ/ЗГВ), ПМК. Гранулы имели преимущественно круглую форму с наличием пор на поверхности и внутри. Была показана возможность регулирования диаметра получаемых гранул размером используемого наконечника (рис. 1).

Для дальнейших исследования были взяты гранулы, полученные при использовании наконечника на 1000 мкл. Среднее значение размера полученных гранул из П(ЗГБ) составило 2,36 мм с размером пор 100-200 мкм; для сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) – 2,39 мм, 100-400 мкм; для ПМК – 2,23 мм с порами 100-200 мкм. Установлено, что максимумом влагопоглощения (55%) обладали гранулы, полученные из П(ЗГБ), которые имели суммарная пористость 1,23 см<sup>3</sup>/г. Самые низкие значения суммарной пористости характерны для гранул, полученных из сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) (0,06 см<sup>3</sup>/г).

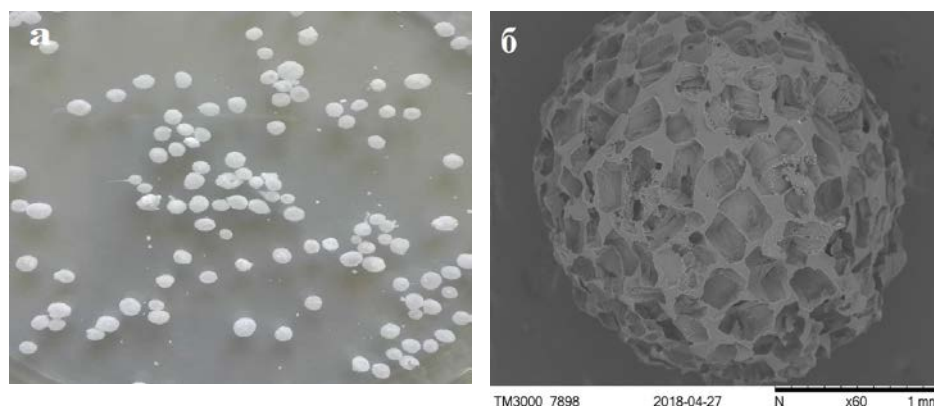


Рисунок 1 – Макрофото (а) и РЭМ снимок (б) гранул из П(ЗГБ), полученных методом осаждения полимера из раствора с порообразующим веществом

Оценивали количество жизнеспособных клеток, культивируемых на разработанных гранулах в МТТ-тесте на 3 и 7 сутки (рис. 2). Установлено, что обработка гранул PRP плазмой приводила к повышению количества пролиферирующих клеток. На гранулах, полученных из сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) без обработки плазмой, было достоверно меньшее количество клеток.

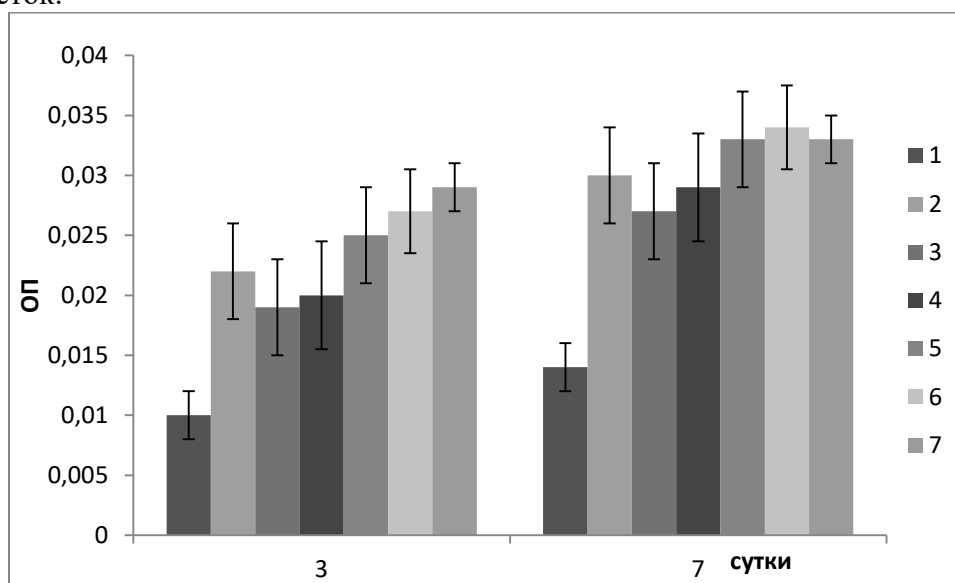


Рисунок 2 – Количество жизнеспособных клеток (МТТ тест): 1 – контроль; 2 – на гранулах из П(ЗГБ), 3 – из П(ЗГБ)/ЗГВ; 4 – ПМК; 5 – гранулы из П(ЗГБ) + плазма; 6 – П(ЗГБ/ЗГВ) + плазма; 7 – ПМК + плазма

**Заключение.** В ходе выполнения работы получены гранулы из ПГА различного химического состава (П(ЗГБ), П(ЗГБ/ЗГВ)) и ПМК. По результатам исследования свойств поверхности наиболее пригодными в качестве пломбировочного материала признаны образцы на основе П(ЗГБ), существенно превосходящие другие образцы по количеству пролиферирующих клеток.

## РАННЯЯ ОЦЕНКА БИМЕДИЦИНСКИХ РАЗРАБОТОК

О.Н. Шишацкий

*Отдел прогнозирования экономического развития Красноярского края ИЭОПП СО РАН,*

*ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, Красноярск, Россия*

*E-mail: shishatskiy@mail.ru*

**Ключевые слова:** ранняя оценка медицинских технологий, инновационная биомедицинская продукция, ценообразование, многокритериальный анализ решений

Современная ситуация в мире характеризуется значительным объемом вложений ресурсов в биомедицинские разработки. Так, глобальные расходы на биомедицинские НИОКР в 2012 году составили 268,4 миллиарда долларов [Chakma *et al.*, 2014].

Помимо частного бизнеса и государства, эти инвестиции осуществляют научные и образовательные организации, и все они заинтересованы в максимизации социально-экономических эффектов разработок. Для управления эффективностью биомедицинских разработок и повышения их инвестиционной привлекательности, в последние годы, все активнее применяются методы ранней оценки медицинских технологий (МТ).

Ранняя оценка МТ – это «методы, используемые для информирования производителей и других стейкхолдеров о потенциальной ценности новых разрабатываемых медицинских продуктов, включая методы для измерения и управления неопределенностью» [I Jzerman M.J., 2017]. В основе ранней оценки МТ лежит готовность общества оплачивать создаваемую дополнительную ценность. Это означает, что стратегия ценообразования на инновационную медицинскую продукцию должна основываться на ценности продукта вместо классического подхода «издержки плюс фиксированная прибыль». Ранняя оценка МТ позволяет разработчику устанавливать цену с учетом принятого в обществе уровня стоимости за единицу ценности.

Для того, чтобы определить, сможет ли новая МТ обеспечить дополнительную ценность в здравоохранении, требуется, чтобы ее применение продемонстрировало улучшение здоровья в показателях конечных результатов, в сравнении с повсеместно используемой МТ (напр. снижение боли или смертности, а не отличие от промежуточных результатов, напр. лабораторные показатели).

Для принятия решения об инвестировании в трансляцию медицинской идеи в МТ, следует установить ценность технологии с точки зрения системы здравоохранения, соответствие предпочтениям тех, кто будет ее использовать и будет ли привлекательным для бизнеса разработка и выпуск этой МТ. С этой целью кроме традиционных инструментов, таких как бизнес-планирование и анализ капиталовложений, и проводится ранняя оценка МТ с использованием раннего клинико-экономического моделирования, которое дополняется количественными методами для анализа предпочтений и удобства использования, а также качественное рассмотрение параметров МТ.

**Цель работы** – на основе обзора исследований в области ранней оценки МТ предложить для применения в системе здравоохранения РФ метод, который бы позволил прогнозировать потенциальную ценность разрабатываемых медицинских продуктов.

**Материалы и методы** – выполнен аналитический обзор литературных источников, посвященных определению ценности потенциальной медицинской продукции на ранних этапах ее разработки.

**Результаты.** Установлено, что в большей части эмпирических исследований с использованием клинико-экономических моделей, для измерения ценности МТ используют годы жизни с поправкой на качество (англ. – quality adjusted life-year, QALY). Однако использование QALY для обоснования распределения ресурсов применимо не во всех

системах здравоохранения. Ряд экспертов отмечает, что QALY отражает не все составляющие ценности для общества и пациентов.

В российской системе здравоохранения нормативно предусмотрена оценка (комплексная оценка) только зарегистрированных МТ (лекарственных препаратов и имплантируемых медицинских изделий), публикаций на тему ранней оценки новых МТ в процессе разработки практически нет. Использование в России QALY как критерия эффективности на сегодняшний день затруднено по причине отсутствия стандартизированной методики расчета, а также отсутствия единых тарифов для перевода профилей состояний здоровья в полезность [Мусина, 2017].

В ходе исследования работ, посвященных вопросам раннего определения ценности новой МТ, установлено, что в условиях российской системы здравоохранения наибольшую перспективу применения имеет ранняя оценка на основе многокритериального анализа решений (МКАР).

МКАР – это серия методов, предназначенная для поддержки лиц, принимающих решения, вынужденных делать многочисленные, иногда противоречивые оценки. Применение МКАР позволяет выявлять эти противоречия и достигать компромиссы в ходе прозрачного процесса [I Jzerman M.J., 2011]. МКАР является инструментом, который поддерживает и облегчает процесс принятия решений в ходе разработки. Использование подхода основывается на применении ряда критериев и обеспечивает выбор из нескольких альтернатив. Применение МКАР в ранней оценке МТ будет способствовать объективности и прозрачности оценки, принятию эффективных решений на ранних стадиях создания медицинского продукта. Это позволит в дальнейшем разработать методику проведения ранней оценки МТ с использованием МКАР, что повысит эффективность выделения и использования ресурсов для разработки новых МТ. Это соответствует приоритетам, обозначенным в документах стратегического развития страны, в том числе ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

**Заключение.** На основе публикаций в области экономического анализа разрабатываемых биомедицинских продуктов определен подход, применение которого направлено для использования в системе здравоохранения РФ для прогнозирования ценности новых медицинских технологий на ранних стадиях разработки.

### **Литература**

Мусина Н. З., Федяева В. К. Методы расчета QALY как интегрального показателя эффективности в процессе комплексной оценки лекарственных препаратов. Фармакоэкономика. Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология. 2017; (10) 1: 66-71. DOI: 10.17749/2070-4909.2017.10.1.066-071.

Chakma J., Jagsi R., Sammut S., Global Biomedical R&D Expenditures // J. New England Journal of Medicine – 2014. – 370(25):2452-2452. DOI: 10.1056/NEJMc1405176

I. Jzerman M.J., Steuten L.M., Early Assessment of Medical Technologies to Inform Product Development and Market Access // J. Appl Health Econ Health Policy – 2011; 9 (5): p.331-347. DOI: 10.2165/11593380-000000000-00000

I. Jzerman M., Koffijberg H., Fenwick E., Krahn M. Emerging Use of Early Health Technology Assessment in Medical Product Development: A Scoping Review of the Literature // J. PharmacoEconomics. – 2017. – № 35. – P. 727–740.



**РАЗДЕЛ 3.**

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ**



## **CLOSURE OF THE EARTH'S BIOSPHERE: EVOLUTION, CURRENT STATE AND PERSPECTIVES**

**S.I. Bartsev<sup>1,2</sup>, A.G. Degermendzhi<sup>1</sup>, A.B. Sarangova<sup>2</sup>**

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

*Siberian Federal University, Svobodny 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

*E-mail: bartsev@yandex.ru*

One of the key properties of living beings is their ability to exponential growth at unlimited substrate. So it's easy to calculate that the offspring of single photosynthetic bacterium of 1 hour generation time can cover the Earth's surface with the layer of 10 km thick for 5 days. On the other hand if the consumption of CO<sub>2</sub> by terrestrial plants was the only process, then all carbon of the atmosphere would be consumed in about 12 years and life on earth would stop. We can live further only because the net primary production is surprisingly accurately compensated by CO<sub>2</sub> flux due to soil respiration. Over several tens of thousands of years atmospheric concentration of CO<sub>2</sub> up to modern times has undergone no changes. Up to modern times the biosphere demonstrated the highest level of closure with respect to carbon manifesting the action of Vernadsky principle of matter flows closure. In the paper possible theoretical scheme of forming the closure of the Earth's biosphere from the beginning of life is considered. The essence of Darwin-Vernadsky paradox of the closure formation declaring that the closure of the biosphere is not an adaptive feature of an individual organism under pressure of natural selection is discussed and possible ways of its resolving is considered.

Current state of the biosphere is characterized by a faulty closure with respect to various elements and especially carbon due to the combustion of fossil fuels. Mathematical models show that increasing the amount of limiting biogenic element leads to decreasing stability of closed ecosystem. Obvious nonlinearity of the biosphere can represent itself via threshold switching and run off dynamics, which can lead to catastrophic events. Possible ways to prevent further development of negative tendencies by means optimum environment management and via debunking some ecological myths are discussed.

## **БИОИНДИКАЦИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕЛОСТНОСТИ ОЗЕР**

**А.М. Беляева<sup>1</sup>, Д.Р. Фишер<sup>2</sup>, М.С. Квист<sup>3</sup>, Д.А. Даунин<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Государственный университет Айовы, 201 Бэсси Холл, Эймс, Айова, США, 50011,*

<sup>2</sup>*Государственный университет Северной Каролины, <sup>3</sup>Университет Айдахо,*

<sup>4</sup>*Университет Миннесоты*

**Ключевые слова:** биоиндикация, зообентос, индекс, эвтрофикация, озера

**Введение.** Культурная эвтрофикация пресных вод является широко признанной проблемой ухудшения качества воды. Из-за интенсивного сельского хозяйства большинство озер штата Айова, США, являются эвтрофными и гиперэвтрофными, и не поддерживают биологическую целостность водных экосистем, которая определяется «способностью поддерживать сбалансированные интегрированные, и адаптивные сообщества организмов, обладающее видовым составом, разнообразием и функциональной организацией, сравнимой с видовым составом естественной среды обитания в регионе» [1].

**Цель работы:** описание нового метода мультиметрического индекса биологической целостности озер США на основе учета фитопланктона, зоопланктона, макрозообентоса и рыб.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 45 озерах, в которых общая концентрация фосфора варьировала от 21 до 381 мкг/л. Пробы химического состава воды, фитопланктона и зоопланктона отбирали ежегодно три раза в год в период с 2001 по 2011 год. Макробеспозвоночные животные и рыбы были отобраны с 2008 по 2012 год. Так как в Айове все озера антропогенно-измененные и не могут служить референтной точкой для сравнения, ранжировали озера на основе их качества воды. Для этого использовали основной компонентный анализ (РСА), чтобы скомпиллировать показатели качества воды в несколько измерений. Анализ включил 11 параметров: прозрачность воды по Секки диску, температуру воды, растворенный кислород, щелочность, рН, концентрацию хлорофилла *a*, общего фосфора, общего азота, аммиака с аммонием, растворенного органического углерода и общее количество взвешенных веществ. Первый основной компонент (PC1) объяснил наибольшее количество вариации (37 %) среди показателей качества воды и отразил градиент прозрачности воды и трофического статуса. PC1 положительно коррелировал с концентрацией хлорофилла *a*, общего фосфора и общего количества твердых взвешенных частиц, и отрицательно коррелировал с прозрачностью воды. Все озера были спроецированы на PC1 градиент. 25-ый процентиль озер с наилучшим качеством воды и 75-ый процентиль озер с наихудшим качеством воды были выделены в отдельные группы для сравнения их биологических сообществ.

Таксономические группы (ТГ) были охарактеризованы по разнообразным биологическим показателям (БП), которые включали: индексы разнообразия, выровненность сообществ, процентную долю трофических гильд, соотношение разных таксонов и т. д. Все БП были проверены на способности различать озера 25-ого и 75-ого процентяля по уровню межквартильного перекрытия на собственных диаграммах размаха [2]. Каждому БП присваивалось значение ранга от 0 (не дискриминирующие) до 3. БП с рангом 0 не рассматривали для включения в индекс. Далее БП, увеличивающиеся в ответ на загрязнение, были расположены в порядке возрастания, а БП, уменьшающиеся в ответ на загрязнение, – в порядке уменьшения. Затем все значения были разделены на квартили, где первый квартиль представлял лучшие значения для этого БП в изученных озерах. Последнее значение, которое вошло в первый квартиль, было названо «критическим значением» (КЗ). Каждому БП было присвоено его индивидуальное КЗ. Далее озерам со значениями БП, увеличивающихся в ответ на загрязнение, и меньше КЗ присваивался 1 балл за каждый параметр, а также 1 балл присваивался за каждый БП, уменьшающийся в ответ на загрязнение. Затем все баллы в пределах каждой ТГ для каждого озера были суммированы и умножены на коэффициент, который стандартизировал их по шкале от 0 до 100 (100 было разделено на число БП, включенных в этот индекс в пределах каждой ТГ). Затем эти стандартизованные баллы для всех ТГ, относящихся к общему квартилю озер на основе водной химии, суммировали и снова усредняли, чтобы получить общий балл для всех ТГ для каждого квартиля. Полученная градация позволила классифицировать биологическую целостность озер и присвоить им категории как «наилучшие доступные», «хорошие», «средние» или «плохие». Также мультиномиальная регрессия была использована для подтверждения того, что БП, важные для дискриминации качества воды, присутствуют в этом индексе.

**Результаты.** Из 475 БП, проанализированных используя диаграмму размаха, 145 имели дискриминационную силу от слабого (ранг = 1) до сильного (ранг = 3). Финальный мультиметрический индекс включил в себя 33 БП (11 – фитопланктона, 8 – зоопланктона, 11 – зообентоса и 6 – рыб). Важно отметить, что каждая из ТГ в разной степени различала

качество воды, и сама по себе не могла отделить озера разных категорий качества воды. Результаты показывают, что сообщества фитопланктона дифференцировали озера двух категорий, объединяя «наилучшие доступные» и «хорошие» в одну группу и «средние» и «плохие» – в другую. Зоопланктон различал озера трех категорий: «лучшие доступные», «плохие», и объединял в одну категорию «хорошие» и «средние» озера. Зообентос отделял только «плохие» озера от остальных, а рыбные сообщества отличали только «наилучшие доступные» озера от всех других. Когда для биоиндикации использовали все группы организмов, то все категории качества воды были дифференцированы, что обеспечило наиболее точную биоиндикацию.

**Заключение.** Биоиндикация с использованием нескольких ТГ позволяет более полно и достоверно характеризовать состояния сообществ в озерах. Показано, что когда отсутствует возможность использовать множественные биоиндикаторы, приоритет должен отдаваться планктонным сообществам.

### Литература

1. Karr, J.R., Dudley D.R. Ecological perspective on water quality goals [Текст] / J.R. Karr, D.R. Dudley // Environmental management. – 1981. – № 5. – С. 55-68
2. Barbour, M. T., Gerritsen, J., Griffith, G.E., Frydenborg, R., McCarron, E., White, J. S., Bastian, M. L. A framework for biological criteria for Florida streams using benthic macroinvertebrates // Journal of the North American Benthological Society. – 1996. – № 15. – С. 185-211.

## ЗООБЕНТОС КАК ИНДИКАТОР ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОХРАНИЛИЩА НА Р. БУГАЧ, РАСПОЛОЖЕННОГО В РАЙОНЕ Г. КРАСНОЯРСКА

**В.А. Лавринович**

*Сибирский федеральный университет*

*Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Россия, г. Красноярск*

*E-mail: vika.la@list.ru*

**Ключевые слова:** зообентос, биоиндикация, качество воды, численность, биомасса, трофический статус

Донные беспозвоночные являются чувствительными индикаторами загрязнения биогенными и токсическими веществами, закисления и эвтрофикации водных объектов. Структурные и функциональные характеристики зообентоса являются перспективным элементом системы мониторинга загрязнения поверхностных вод и позволяют определить экологическое состояние и трофический статус водных объектов; оценить качество поверхностных вод как среды обитания организмов; определить совокупный эффект комбинированного действия загрязняющих веществ; локализовать источник загрязнения; установить тип загрязнителей и возникновение вторичного загрязнения вод

**Цель работы** – оценка качества воды водохранилища на р. Бугач по структуре зообентоса.

Исследовано водохранилище, которое является зоной отдыха, рыболовства в Октябрьском районе г. Красноярска. Водоохранилище образовано на р. Бугач, в него впадает ручей Минино, дренажный сток осуществляется через плотину.

Пробы зообентоса отбирали на четырех станциях в трех повторностях (литораль), с помощью скребка Дулькейта с мая по август 2017 года [1]. На станциях № 1 и № 4 грунт представлен преимущественно илом, на станциях № 2 и № 3 – галькой. Температура воды в водохранилище летом варьировала от 21,3 °С до 24,8 °С.

**Результаты.** В составе донных беспозвоночных водохранилища на р. Бугач зарегистрировано 18 видов донных беспозвоночных, из них хирономиды и моллюски – по 3 вида, олигохеты, клопы, личинки двукрылых, пиявки – по 2 вида, жуки, поденки, веснянки, ручейники – по одному виду.

Плотность зообентоса варьировала: численность от 800 экз/м<sup>2</sup> до 1807 экз/м<sup>2</sup>, биомасса от 2,85 г/м<sup>2</sup> до 12,41 г/м<sup>2</sup>. По сравнению с данными за 1998 год (средняя вегетационная численность зообентоса составляла 5761±1510 экз/м<sup>2</sup>, биомасса – 27,5±6,9 г/м<sup>2</sup>) плотность бентофауны снизилась в 4 раза, что предположительно связано со сбросом воды в водохранилище и его осушением в 2014 году, во избежание подтопления домов, находящихся рядом с водоемом.

Трофический статус водохранилища, оцененный по биомассе зообентоса, соответствовал α-олиготрофному классу “средней” градации [3]. Практически по всему району исследования доминировали личинки хирономид *Chironomus plumosus* Linnaeus (индикаторы «грязной» воды) и *Glyptotendipes gripekoveni* Kieffer (индикаторы «умеренно-загрязненной» воды), моллюски *Limnaea ovata* Lamarck (индикаторы «умеренно-загрязненной» воды), пиявки *Erpobdella octoculata* Linnaeus (индикаторы «загрязненной» воды).

Оценку качества воды проводили по трем индексам, рекомендованным Росгидрометслужбой (2011 г.). По индексу Вудивисса [2] качество воды оценено на уровне IV класса, то есть вода грязная. По олигохетному индексу [2] получен абсолютно противоположный результат, – качество воды соответствовало I классу, вода условно чистая. По индексу сапробности [2] качество воды оценено на уровне III класса, вода загрязненная.

В гидробиологии принято считать достоверной ту оценку качества воды, которая ниже, соответственно мы придерживаемся оценки качества воды по индексу Вудивисса, – вода грязная. Данную ситуацию можно объяснить высокой антропогенной нагрузкой (поступление минеральных удобрений с сельхозугодий водосборной территории, поступление органических веществ, вследствие выпаса крупного рогатого скота, активное место отдыха населения) на водохранилище.

### Литература

1. Абакумова В.А. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ленинград: Гидрометеиздат, 1983
2. "РД 52.24.309-2011. Руководящий документ. Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши" (утв. Росгидрометом 25.10.2011)
3. Китаев С.П. Экологические основы биопродуктивности озер разных природных зон. Москва: Наука, 1984.

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛЕТНЕГО ФИТОПЛАНКТОНА ВОДОХРАНИЛИЩА БУГАЧ

О. А. Абрамова, Е. А. Иванова

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

E-mail: olga.abramovaaa@mail.ru

Водоохранилище Бугач создано в 1958 г. на вторичном притоке Енисея реки Бугач. Находится оно в степной местности, частично занятой полями и пастбищами, на окраине города Красноярска. Водоохранилище используется населением города для отдыха, купания и любительской ловли рыбы, поэтому качество воды этого водоема должно стать предметом тщательного изучения.

Каждый год в летнее время водоохранилище подвержено «цветению», вызываемого цианобактериями [3]. В 2002 году силами ученых Института биофизики СО РАН и Сибирского федерального университета была проведена биоманипуляция в водоохранилище Бугач, приведшая к снижению уровня «цветения» воды [1]. Однако, если биоманипуляцию не проводить регулярно, то через несколько лет «цветение» воды повторится. В апреле 2014 года для борьбы с «цветением» воды был проведен спуск воды водоохранилища с последующими планируемыми работами по удалению грунтов ложа водоохранилища. Однако эти работы не были выполнены полностью. К середине июня 2014 года водоохранилище уже было заполнено водой реки Бугач. В июле-августе этого же года выявлено «цветение» воды цианобактериями.

**Цель работы** – оценка современного состояния летнего фитопланктона водоохранилища Бугач в период «цветения» воды.

**Материал по фитопланктону** был отобран в июле 2014 г. и 2017 г. на 4 станциях водоема. Отбор проб и обработка проводили в июле (период максимального «цветения») по общепринятой методике [2]. Поверхностная температура воды на всех станциях отличалась незначительно и изменялась в пределах 23-25°C. Активная реакция воды колебалась в пределах 7,78-7,95. Концентрация фосфора составила 0,05 мг/л; концентрация азота варьировала в пределах 0,043-0,059 мг/л.

**Результаты.** Таксономический состав фитопланктона водоохранилища Бугач по состоянию на 2017 год увеличился на треть по сравнению с 2014 годом и насчитывал 35 видов из 5 отделов: *Cyanobacteria* – 8, *Bacillariophyta* – 5 видов, *Chlorophyta* – 17, *Euglenophyta* – 4, *Dinophyta* – 1. Показатели индекса Шеннона подтверждали увеличение видового богатства более, чем в 2 раза за период 2014-2017 годы, что связано со стабилизацией гидрологического режима.

В июле 2017 года доминирующим видом по численности и биомассе практически на всех станциях водоема был *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs, дающий основной вклад в общую численность и биомассу. В июле 2014 года по численности и биомассе преобладал другой вид цианобактерий – *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. et Kom., вносящий основной вклад в общую численность и биомассу. Средние значения общей численности и биомассы от 2014 к 2017 году значительно уменьшились. Если в июле 2014 года показатели численности изменялись в пределах 267,2 – 433,8 млн. кл/л, а биомассы – 45,48 – 60,59 мг/л, то в июле 2017 года значения общей численности варьировала в пределах 57,6 – 256,3 млн. кл/л, а биомассы – 10,54 – 18,95 мг/л. Концентрация хлорофилла *a* фитопланктона на всех станциях превышала 10 мкг/л. Это говорит о том, что водоохранилище Бугач относится к водоемам эвтрофного типа.

**Заключение.** Качество вод водоохранилища Бугач изменилось в сторону ухудшения. Если в июле 2014 г. на всех станциях водоема качество воды оценивалось I классом

степенью загрязнения «условно чистая», то в июле 2017 г. на ряде станций выявлен II класс качество вод со степенью загрязнения «слабо загрязненная» [4]. Таким образом, показатели по фитопланктону свидетельствуют об ухудшении качества воды на современном этапе существования водохранилища.

### Литература

1. Гладышев М.И., Чупров С.М., Колмаков В.И., Дубовская О.П., Задорин А.А., Зуев И.В., Иванова Е.А., Кравчук Е.С. Биоманипуляция «top-down» в небольшом водохранилище без дафний // Сибирский экологический журнал, 2006. – 55-64 С.
2. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах: фитопланктон и его продукция. – Л., 1984. – 32 с.
3. Kravchuk E.S., Ivanova E.A., Gladyshev M.I. Seasonal dynamics of akinetes of *Anabaena flos-aquae* in bottom sediments and water column of small Siberian reservoir // Aquatic Ecology. – 2006. – № 40. – P. 325-336
4. РД 52.24.309-2011. Руководящий документ. Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши. (утв. Росгидрометом 25.10.2011). Электронный ресурс: [www.consultant.ru](http://www.consultant.ru).

## АЛКЕНОНЫ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СОЛЕННЫХ ОЗЕР КАК БИОИНДИКАТОР ПАЛЕОТЕМПЕРАТУРЫ В ПОЗДНЕМ ГОЛОЦЕНЕ

А.О. Бульхин

*Сибирский федеральный университет, пр-т Свободный 79, 660041, Красноярск,  
Российская Федерация*

*E-mail: [bulkhinlive@yandex.ru](mailto:bulkhinlive@yandex.ru)*

**Ключевые слова:** алкеноны, палеоклиматология, лимнология, индексы ненасыщенности алкенонов, гаптофитовые водоросли, донные отложения

В Институте биофизики СО РАН выполняются совместные НИР с Университетом Ван (Турция) и Институтом геологии и минералогии им. Соболева СО РАН (г. Новосибирск) работы по исследованию динамики глобального потепления и аридизации в азиатских районах за последние тысячелетия по донным отложениям меромиктических водоемов.

В настоящее время проблема изменения климата приобрела глобальный характер и является одной из важнейших проблем XXI века. Наблюдения метеорологов показывают, что за последние 100 лет увеличилась концентрация парниковых газов, произошло увеличение средней годовой температуры на  $\frac{3}{4}$  градуса [1], вызывающей таяния ледников и повышение уровня Мирового океана.

Для отслеживания климатических изменений в представленной работе использовали палеотемпературные биомаркеры – алкеноны, которые были обнаружены в морских отложениях около 35 лет назад и которые были использованы для реконструкции температуры поверхностных вод океанов (SST) [2]. Данный класс липидов является полиненасыщенными длинноцепочечными углеводородами с кетогруппой, которые продуцируются несколькими представителями гаптофитовых водорослей. Гаптофиты (лат. *Haptophyta*) способны изменять уровень ненасыщенности и количество углерода в цепи своих липидов в зависимости от температуры среды. Как правило, длина цепи колеблется от 35 до 40 атомов углерода и содержат 2-4 транс-двойные связи. Длинноцепочечные кетоны,



как правило, хорошо консервируются в донных отложениях, не меняя ненасыщенности синтезирующих их организмов, в то время как ненасыщенность жирных кислот седиментов не соответствует составу жирных кислот продуцентов [3].

**Цель работы** – выявить количественный и качественный состав алкенонов в донных отложениях оз. Ши́ра и оценить возможность использования этих показателей в качестве биоиндикаторов экологического состояния озера в прошлом.

Донные отложения озера Ши́ра длиной 285 см анализировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Возраст отложений определялся радиоизотопными методами по распределению элементов  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  и  $^{14}\text{C}$ , а также прямым визуальным подсчетом годовичных слоев (варв).

**Полученные результаты** показали, что экстрагированные алкеноны из образцов донных отложений представлены смесью нескольких фракций с разной длиной углеродной цепи и количеством двойных связей. В экстрактах обнаружены алкеноны с 37, 38, 39 и 40 атомами углерода, фракции С 37 и С 38 представлены соединениями с 4, 3 и двумя двойными связями, С 39 только с 4 и 3. Обнаружить фракцию С40 удавалось редко. Распределение алкенонов в образцах керн неравномерное. В отдельных пробах, а именно, на глубинах 41-42 см, 43-44 см, с 84-85 до 88-89 и ниже (рис.1 А) их детектировать не удалось. На протяжении всей длины керн наблюдалось колебание средней концентрации кетонов от 0,3 до 1,5 мкг/г. Исключения занимают только пробы 32-33, 110 – 111 и 236 – 238, где концентрация могла достигать до 79 мкг/г (рис.1 Б). Любопытно, что у этого пика концентрации алкенонов нет соответствующего пика пигментов в том же образце. В большей части экстрактов есть фракции С37 и С38, в то время как С39 прослеживается не во всех пробах. С39 обычно отсутствует в экстрактах с минимальной концентрацией алкенонов. Сомнительно, вызвано это слишком малой для детекции концентрацией С39 или изменением видового состава либо метаболизма алкенон-продуцирующих организмов озера в соответствующий период времени.

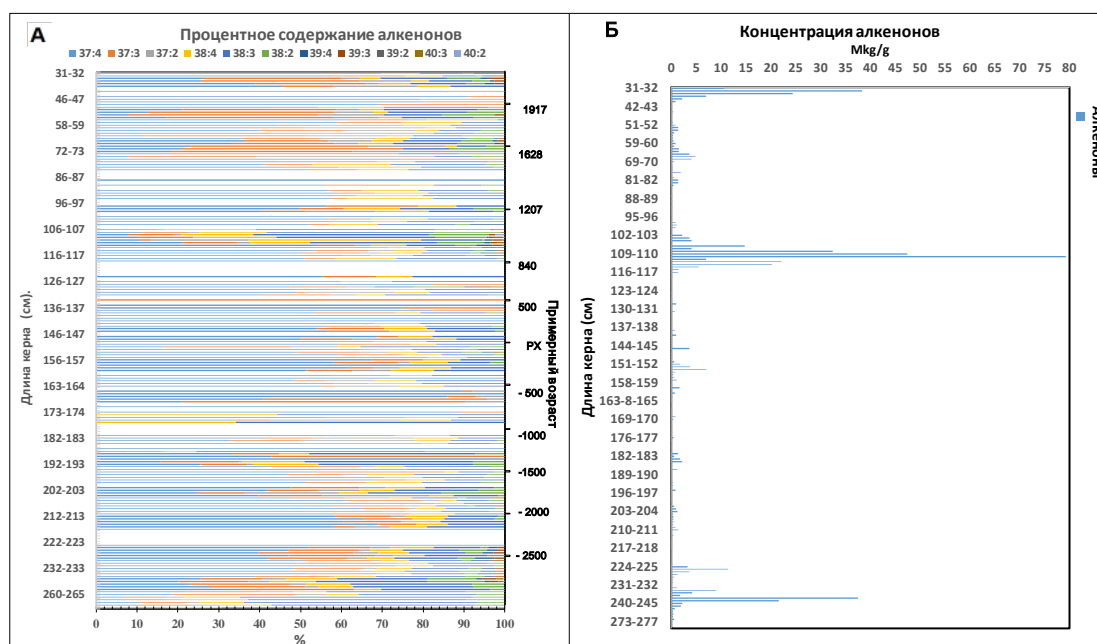


Рисунок – Распределение алкенов в образцах керн: А – доленое распределение алкенонов С37, С38, С39 по степени их ненасыщенности в донных отложениях озера Ши́ра; Б – общая концентрация алкенонов

Показано, что динамика индексов насыщенности демонстрирует отчетливые изменения в долях алкенонов C37 и C38 с разным количеством двойных связей. Подобные изменения могут указывать на изменения внешних условий, в особенности температуры и солености воды в озере Шира. Преобладающим алкеноном является нечетный полиненасыщенный кетон C37 с 2-мя, 3 и 4 двойными связями. Первоначальная корреляция коэффициента ненасыщенности этого алкенона свидетельствует о возможности использования его в палеоклиматических реконструкциях соответствующего региона.

#### **Литература**

Мохов И. И. Российские климатические исследования в 2003–2006 гг. Известия РАН. Физика атмосферы и океана. Институт физики и атмосферы им. А. М. Обухова РАН. – 2009. – том 45. №2. – С. 180–192.

Marlowe I.T. Long chain unsaturated ketones and esters in living algae and marine sediments. / I.T. Marlowe, S.C. Brassell, G. Eglinton, J.C. Green // Organic Geochemistry 6. – 1984. P135–141.

Thomas, S. Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems. / S. Thomas, A. Elizabeth // – 2011. – P. 207–211.

## **METHANOTROPHIC ABILITY OF MOSSES AND LICHENS ASSOCIATED BACTERIA IN THE BAIKAL LAKE REGION**

**V. Kadutskiy<sup>1</sup>, S. Evgrafova<sup>1,2</sup>, L. Krivobokov<sup>2</sup>, S. Prudnikova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Siberian Federal University, 660041, Svobodnyy 79, Krasnoyarsk, Russia*

<sup>2</sup>*V.N. Sukachev Institute of Forest FIC KRC SB RAS, 660036, Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, Russia*

*E-mail: evgrafova@ksc.krasn.ru*

Methanotrophic bacteria are a unique group of microorganisms structurally and functionally adapted to use methane as a source of carbon, which is of great interest due to their ability to oxidize atmospheric methane [1]. At present, it is known that the methanotrophic process associated with mosses which are in symbiosis with methanotrophic bacteria. Mosses provide bacteria by habitat and protection, methanotrophic bacteria provide mosses with carbon dioxide resulting of methane oxidation, whose content in moss tissues can reach 32% [4].

The lake Baikal is known as a great reserve of gas hydrates. Gas hydrates are crystalline water-based solids physically resembling ice, in which small non-polar molecules (typically gases) are trapped inside “cages” of hydrogen bonded, frozen water molecules. Usually 99 percent of gas hydrates contain methane [3].

Gas hydrates cause serious concern, such as they are dangerous sources of greenhouse gases. Especially this problem is important in present days, because of global warming, which accelerates the release of gases from gas hydrates, thereby increasing the concentration of greenhouse gases in the atmosphere [2].

Methanotrophic bacteria in this respect are in a scope of interest of world scientific community, as a natural filter on the way of emission methane into the atmosphere. In our research we studied mosses and lichens sampled in Baikal region (Figure) for methane oxidizing ability of associated bacteria, at concentrations of methane close to atmospheric.

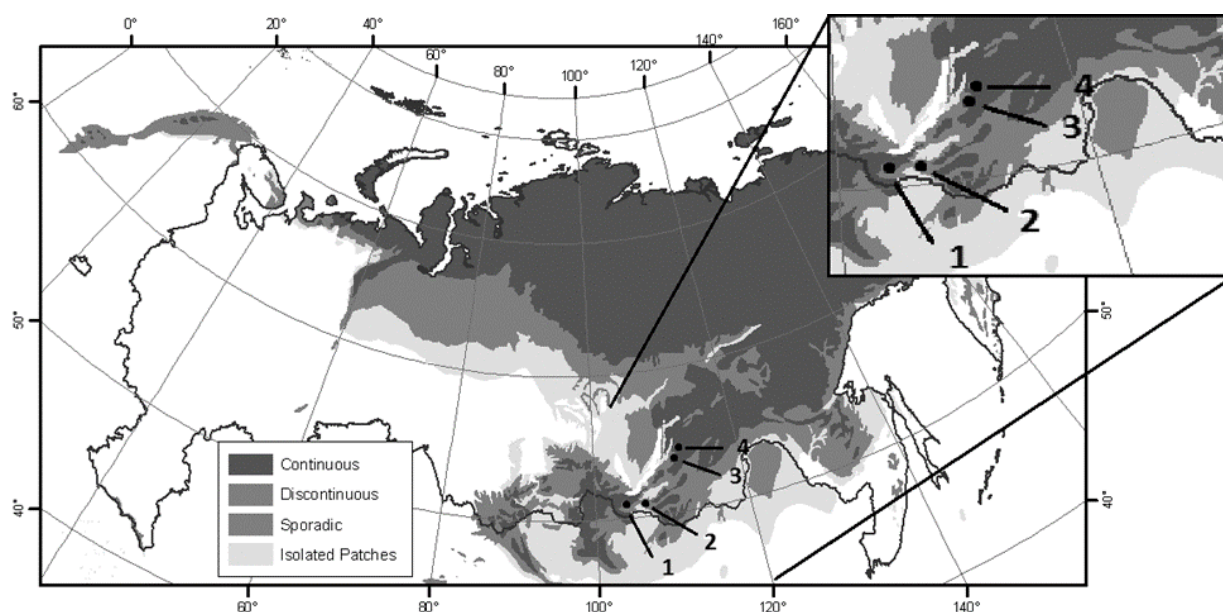


Figure – Sampling sites on the map of permafrost distribution in Russia. Sites 1, 3, 4 located on permafrost soils, site 2 located on the non-permafrost soils.

The consumption of methane in consortia of mosses and lichens and associated microorganisms was measured in laboratory incubation experiments. The methanotrophic activity registered using gas analyzer Picarro 2201-i (Picarro Inc., USA) as a shift in the isotopic composition  $\delta^{13}\text{C}$  in methane. It was shown that samples which were collected in permafrost soils have a larger ability to methanotrophy than sample collected in non-permafrost soils (Tabl. 1).

Table 1 – Methane consumption dynamic and  $\delta^{13}\text{C}$  in methane emitted by mosses and lichens consortia of studied areas

Studied areas	Samples	$\text{CH}_4$ , ppm			$\delta^{13}\text{C}\text{-CH}_4$ , ‰		
		0 ч	4 ч	24 ч	0 ч	4 ч	24 ч
2	Lichens from non-permafrost soils	1,97	1,96	2,00	-53	-31	-15
2	Mosses from non-permafrost soils	1,97	1,95	1,88	-57	-30	-19
1	Mosses from permafrost soils	1,97	1,98	1,90	-47	-14	156
3	Mosses from permafrost soils	1,97	1,96	1,93	-51	-22	118
3	Lichens from permafrost soils	1,97	1,98	1,90	-54	-42	-26
4	Mosses from permafrost soils	1,97	1,89	1,90	-48	-40	-30
1	Epiphytes	1,97	1,93	1,54	-46	15	205

We separated all samples into individual species of mosses and lichens and measured methanotrophic ability of the species. It is appeared that lichens *Cladonia stellaris* and *Cetraria laevigata* have great methanotrophic ability on a level with mosses *Rhytidium rugosum* and *Dicranum polysetum* (Table. 2).

Table 2 – Methane consumption dynamic and  $\delta^{13}\text{C}$  in methane emitted by individual species of mosses and lichens consortia of studied areas

Studied areas	Samples	CH <sub>4</sub> , ppm			$\delta^{13}\text{C}$ -CH <sub>4</sub> , ‰		
		0 ч	4 ч	24 ч	0 ч	4 ч	24 ч
2	<i>Cladonia stelarlis</i>	1,90	1,83	1,82	-41	-11	-5
3	<i>Cetraria laevigata</i>	1,90	1,07	1,12	73	780	6900
4	<i>Rhytidium rugosum</i>	1,90	1,92	1,88	-60	-58	-47
2	<i>Dicranum polysetum</i>	1,90	1,84	1,81	-59	-55	-42
1	Epiphytes	1,90	1,88	1,87	-56	-58	-22
	Blanc	2,00	2,00	1,91	-50	-51	--52

Thus, we showed that metanotrophs associated with mosses and lichens growing in Baikal region have a great ability to oxidize methane in concentrations close to atmospheric. This ability is larger in species collected in permafrost area of the lake.

*This work was supported in part by the Russian Government Megagrant (project no. 14.B25.31.0031), by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-04-01677-a).*

#### References

1. Methanotrophic bacteria: monografy / V.F. Galchenko; Geos, 2001. P. 496.
2. Granin N. G., Granin L. Z. Gas hydrates and gas efflux in Baikal Lake // Geology and Geophysics .2002. T. 43. № 7. P. 629—637.
3. Klerks Y., Zemskaya T.I., Hlistov O.M. Methane hydrates in deep see sediments surface level of Baikal Lake // dan.2003. № 6. p. 822-826.
4. Nardy Kip., Julia F., van Winden., Yao Pan., Levente Bodrossy., Gert-Jan Reichart., Alfons J. P. Smolders., Mike S. M., Jetten., Jaap S., Sinninghe Damsté., Huub J. M. Global prevalence of methane oxidation by symbiotic bacteria in peat-moss ecosystems//Nature Geoscience.2010. № 3. P. 617–621.

## ДОННЫЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ В ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ ПРИУСТЬЕВЫХ РАЙОНОВ РЕК БЕРЁЗОВКА И ЕСАУЛОВКА (КРАСНОЯРСКИЙ КРАЙ)

Н. И. Кислицина

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск*

*E-mail: nadezhda.kislitsina2016@yandex.ru*

В последнее время постоянно растет поступление разнообразных загрязняющих веществ в биосферу, в частности в водоемы и водотоки, что приводит к быстрому обеднению биоразнообразия. Причиной этого является экстенсивное развитие хозяйства, малоэффективное и все расширяющееся использование природных ресурсов. В связи с возрастающим развитием энергетики, особенно тепловых и атомных электростанций, неуклонно растет тепловое загрязнение водоемов. Благодаря тому, что зообентос и сообщества донных беспозвоночных являются чувствительными индикаторами различных типов загрязнения, их используют для оценки качества воды. Многие водотоки и водоёмы

используются человеком как источник водоснабжения, как ресурсный потенциал и в рекреационных целях, поэтому изучение зообентоса становится все более актуальным [1, 2].

**Цель:** оценить качество воды устьев рек Берёзовка и Есауловка.

**Методы.** Для проверки влияния стоков теплых вод на зообентос, а значит и на качество воды, были исследованы устье реки Берёзовка, принимающее стоки с Красноярской ТЭЦ-1, и устье реки Есауловка. Обе реки – правобережные притоки реки Енисей находящиеся в одинаковых климатических условиях. Грунт рек представлен заиленной галькой. Пробы отбирали с помощью гидробиологического скребка и рамки, с площадью захвата 1/16 в июне, июле и августе 2017 г в трёх повторностях. Температура рек Берёзовка и Есауловка варьировала соответственно от 15,3 до 22,7 °С и от 13,6 до 17,9 °С.

**Результаты.** В устье реки Есауловка практически весь период исследования по численности и биомассе доминировали ручейники *Ceratopsyche nevae*, *Kolenati*, которые являются показателями «чистой» воды. В устье реки Берёзовка по плотности доминировали хирономиды *Paratrichocladius inaequalis*, Kieffer, *Orthocladius gr.saxicola*, *Paracladopelma camptolabis*, Kieffer, олигохеты *Lumbriculus variegatus*, O. F. Muller (индикаторы «загрязненной» воды).

Для оценки качества воды устьев рек Берёзовка и Есауловка использовали биотический индекс Вудивиса и индекс загрязнения вод по химическим показателям (ИЗВ) [4]. Данные по гидрохимическому составу воды устья реки Берёзовка предоставлены лабораторией мониторинга вод Среднесибирского управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Среднесибирское УГМС). В устье реки Берёзовка отмечено превышение ПДК нефтесодержащих продуктов в 1,4 раза, ХПК в 2 раза, меди в 5 раз, фосфора в 1,1 раза. Класс качества определялся по РД 52.24.309-2011 [5].

Качество воды в устье реки Есауловка по методу Вудивиса в среднем за весь период исследования оценено на уровне II класса качества (БИ = 5,6 ± 0,5 баллов), что соответствует степени загрязненности воды – слабо загрязненная.

Качество воды устья реки Берёзовка за весь период исследования по методу Вудивиса оценено на уровне IV класса (БИ = 2 ± 0 балла), вода грязная.

По индексу загрязнения водоемов по химическим показателям в среднем за весь период исследования вода в устье реки Берёзовка оценена на уровне III класса качества вод (ИЗВ = 1,7 ± 0,1). Более низкий класс качества вод в устье реки Берёзовка по сравнению с устьем реки Есауловка скорее всего является следствием поступления теплых вод с Красноярской ТЭЦ-1.

### Литература

1. Зообентос равнинных притоков Верхней Оби: монография / Д.М. Безматерных; отв. ред. В.В. Кириллов. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2008 – 186 с.
2. Семерной В. П. Санитарная гидробиология : учебное пособие / В. П. Семерной.- 3-е изд., перераб. и доп.- Ярослав. гос. ун-т.-Ярославль : ЯрГУ, 2005.- 203 с.
3. Абакумова В. А. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ленинград: Гидрометеоиздат, 1983.
4. Гусева Т. В. и др. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды. – М. : Социально-экологический Союз, 2000.
5. РД 52.24.309-2011. Руководящий документ. Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши" – утв. 25.10.2011 – Москва : Росгидромет, 2011 – 87 с.

## ВЛИЯНИЕ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ КУЛЬТУР *PINUS SPP* НА ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБОЦЕНОЗ В АРИДНЫХ УСЛОВИЯХ

А. А Чигринская<sup>1</sup>, В.А Сенашова<sup>2</sup>, Е.Н. Афанасова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет

<sup>2</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

E-mail: a.chigrinskaya@mail.ru

Для степных территорий юга Красноярского края, республик Хакасии и Тыва в той или иной степени подверженных деградации земель и опустыниванию, актуальной является проблема обогащения биологических ресурсов, как и для других аридных территорий, страдающих от неблагоприятных природных явлений и нерациональной хозяйственной деятельности (засухи, суховеи, эрозия, дефляция и др.). Для подобных безлесных территорий критерием оценки лесорастительных свойств почв являются выживаемость, устойчивость и долговечность лесных пород. Разные виды древесных растений могут оказывать специфическое воздействие на почвообразовательные процессы и свойства почв, проявляя, как правило, почвоулучшающий эффект, однако интродукция видов древесных растений в данных условиях ограничивается многими лимитирующими факторами: дефицитом почвенной влаги, повышенной концентрацией легкорастворимых солей, недостатком питательных веществ, слабой биологической активностью.

В лесной практике географические культуры (климатические экотипы/климатипы) нужны для изучения географической изменчивости видов древесных растений. Ряд признаков и свойств климатипов является постоянным и при разведении их в других лесорастительных условиях. Однако, определенные факторы, присущие новому району разведения, оказывают определенное воздействие на рост и развитие растений. Взаимодействие наследственных свойств климатипов и условий среды определяет устойчивость и продуктивность лесных культур [2].

В мае 2017 г. сотрудниками лаборатории генетики и лесной селекции и лаборатории микробиологии и экологической биотехнологии ИЛ СО РАН были высажены географические культуры *Pinus spp*, включающие в себя климатипы сосны обыкновенной и сосны сибирской (далее кедр сибирский) (Республика Хакасия, Ширинский район, участок «Вузовский», ОЭП «Ширинский» ФИЦ КНЦ СО РАН).

**Цель исследований** – оценка первичных изменений в почвенном микробном сообществе, вызванных посадками географических культур хвойных.

**Методы исследований.** Представлены данные по следующим климатипам: кедр сибирский («Монгольский», «Байкальский»), сосна обыкновенная («Усть-Кутский», «Пудожский», «Богучанский»). Образцы почвы отбирали в прикорневой части саженцев в фазу летней вегетации (I декада июля) и фазу осеннего расцветания листвы (III декада сентября). Непосредственно перед посадкой саженцев в I декада мая также были отобраны образцы почвы с каждого участка (нулевая точка). Контролем служил целинный (нераспаханный) участок почвы, прилегающий непосредственно к посадкам. Микробиологические посевы для выявления эколого-трофических групп микроорганизмов проводили согласно классическим методам [5]. Инкубирование засеянных чашек Петри осуществляли при температуре 25 °С. Выросшие колонии учитывали на пятые сутки. Микроскопирование выполняли при увеличении x 1350. Проведен количественный учет колоний неспоровых и споровых бактерий (в том числе актиномицетов), дрожжей и мицелиальных грибов (все данные по численности указаны на 1 г абсолютно сухой почвы). Методом Грегерсена [4] устанавливали грам-принадлежность бактериальных форм. В почвенных образцах исследовали респирометрические микробиологические показатели по

методу субстрат-индуцированного дыхания (СИД) на хроматографе Agilent Technologies 6890 N Network GC (USA): базальное дыхание (БД), микробную биомассу (МБ) [1, 5]. Микробный метаболический коэффициент ( $qCO_2$ ) рассчитывали как отношение скорости базального дыхания к микробной биомассе [1]:

$$БД/C_{\text{мик}} = qCO_2 (\text{мкг } CO_2 - C \cdot \text{мг}^{-1} C_{\text{мик}} \text{ ч}^{-1}).$$

При обработке результатов исследования применяли программу Microsoft Excel 97.

**Результаты микробиологических посевов** показали, что суммарная численность микроорганизмов (на всех питательных средах) на всех изучаемых участках находилась в пределах  $10,4-13,9 \times 10^6$  КОЕ/г.

Для всех участков, кроме «Кедр, Байкал», характерно нарастание численности микроорганизмов с мая по сентябрь. В данном варианте минимальное значение суммарной численности микроорганизмов отмечено в середине вегетации (июль). Возможно, это связано с особенностями микрорельефа/эдафическими факторами; либо с лучшей приживаемостью саженцев данного климатипа, поскольку известно, что в период активной вегетации растения выделяют в окружающую среду различные вещества, обладающие фитонцидными свойствами по отношению к микроорганизмам.

Доминирующей группой на протяжении вегетационного периода являются олиготрофные микроорганизмы (олигонитрофилы и истинные олиготрофы). Актиномицеты выступают содоминантами на всех участках, их численность колеблется от  $0,95 \times 10^6$  КОЕ/г (июль «Кедр, Байкал») до  $246,13 \times 10^6$  КОЕ/г (сентябрь «Сосна, Пудож»). Среди мицелиальных форм преобладают представители отдела *Zygomycota* ( $\geq 90\%$ ), в частности грибы рода *Mortierella* Соем.. Данные микромицеты являются классическими сапротрофами, активно участвующими в разложении органического вещества, предпочитающие не кислые почвы. Самой малочисленной группой являются дрожжи, которые были выявлены только в одном варианте («Сосна, Богучаны»).

Респирометрический анализ почвенных образцов показал, что значение микробного метаболического коэффициента ( $qCO_2$ ), отражающего скорость потребления субстрата микроорганизмами, в опытных участках нарастало к июлю (достигало  $12,6 \text{ мкг } C-CO_2/\text{мг}C/\text{г}$ , участок «Кедр, Монголия») и падало к концу вегетации растений. В контрольном варианте отмечен обратный эффект.

**Заключение.** На основе полученных данных можно сделать вывод о наличии первых признаков изменения нативного почвенного микробоценоза в опытных участках. Следует подчеркнуть, что на данном этапе определяющим фактором изменений является распашка почвенного слоя. В дальнейшем, когда саженцы окрепнут и пойдут в активный рост, важным средоопределяющим воздействием на почвенное микробное сообщество станут выделения их корневой системы растений.

### Литература

1. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв / Ананьева Н.Д. // М.: Наука, 2003. 222 с.
2. Влияние географических культур кедра сибирского и кедра корейского на биологические свойства почвы юга Красноярского края / И. Д. Гродницкая, Г. В. Кузнецова, Г. И. Антонов, [и др.] // Лесоведение. 2016. № 2. С. 135-147.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
4. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria / Gregersen T. // Eur. J. Appl. Microbiol. And Biotechnol. – 1978. – V. 5, N 2. – P. 127 – 132.

5. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils/ Anderson J.P.E., Domsch K.H. // Soil Biol. Biochem, 1978, vol. 10, no. 3, pp. 314–322.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ СНЕЖНОГО ПОКРОВА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

С. Ю. Семёнова<sup>1</sup>, С.Ю. Евграфова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный 79, Россия

<sup>2</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 660036, г. Красноярск, Академгородок 50, стр. 28, Россия

E-mail: icycrewcut@yandex.ru

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются повсеместными загрязнителями окружающей среды. ПАУ образуются путем неполного сжигания органического материала (уголь, нефть, древесина) и транспортируются в атмосфере в аэрозолях [1]. Как правило, центры городов имеют более высокие концентрации загрязнителей, чем пригороды. Твердые частицы могут находиться в воздухе, оседать и конденсироваться в капельках воды или снега, попадая, в конечном счете на почву, в водоемы, в дыхательные пути живых организмов [2]. Микробиологическая нагрузка аэрозолей представлена, в основном, бактериями [3]. Количественное определение аэрозольных микроорганизмов является актуальным, так как микроорганизмы не только участвуют в деградации загрязнителей, но также могут представлять потенциальную эпидемиологическую опасность [4].

**Цель работы** – оценить микробиологическую нагрузку снежного покрова в различных районах г. Красноярска и изучить его изотопный состав.

Для отбора снега снегомер врезали на всю толщину снежного покрова, после чего керн снега собирали в контейнеры. Для анализа снежного покрова использовали общепринятые микробиологические методы. Общую численность органотрофных бактерий определяли на питательном агаре для подсчета микроорганизмов (Plate-Count Agar). Для определения изотопного состава снежного покрова использовали газовый анализатор Picarro. Исследовано 13 точек в черте города Красноярска. Контрольная точка находилась за пределами города в районе аэропорта Красноярск (Емельяново).

**Результаты.** В контрольном образце микроорганизмов не было обнаружено. В черте города количество микроорганизмов увеличивалось с ростом интенсивности транспортного движения и уменьшалось в 2-5 раз, если между местом отбора проб и проезжей частью имелись зеленые насаждения. Максимальное количество микроорганизмов в снежном покрове составило 4,7-5,4 КОЕ/мл в районе улиц Академика Киренского и Копылова соответственно.

Определение метана показало наличие фоновой концентрации во всех образцах снега. Анализ изотопного состава углерода выявил фракционирование изотопов в образцах снега из лесных массивов (в районе Академгородка и СФУ), что может указывать на присутствие метанотрофных микроорганизмов. В районе аэропорта отмечено аналогичное влияние большого количества хвойных насаждений и связанной с ними микрофлоры.

В районах с интенсивным транспортным потоком наблюдали утяжеление изотопного состава углерода, что может быть составляющей техногенного загрязнения. В некоторых образцах отмечен высокий вклад микробного дыхания (биогенный или метаболический углерод) в изотопном составе CO<sub>2</sub>.



**Заключение.** Показано, что на количество микроорганизмов и качество снежного покрова влияют интенсивность движения машин, а также насаждения деревьев.

#### **Литература**

1. Hussein I. Abdel-Shafy. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation / Hussein I. Abdel-Shafy, Mona S.M. Mansour // Egyptian Journal of Petroleum. – 2016. – 25(1). – С.107-123.
2. Kai Wei. Microbial aerosol characteristics in highly polluted and near-pristine environments featuring different climatic conditions / Kai Wei, Yunhao Zheng, Jing Li, et al // Science Bulletin. – 2015. – 16. – С.1439-1447.
3. Mansour A. Alghamdi. Microorganisms associated particulate matter: A preliminary study / Mansour A. Alghamdi, Magdy Shamy, Maria Ana Redal et al // Science of The Total Environment. – 2014. – 479-480. – С.109-116.
4. Напрасникова Е. В., Макарова А. П. Снежный покров в оценке экологического состояния городской среды // География и природные ресурсы. – 2006. – №. 3. – С. 162-166.

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВ И ВОДОЕМОВ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

**Д.А. Шевчук, К.А. Туркин**

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

*E-mail: Shevchuk.95@mail.ru*

Нефть и нефтепродукты являются одними из основных загрязнителей среды. При очистке нефтяных загрязнений на почвах и береговых линиях применяются трудоемкие методы, имеющие недостатки. Например, использование высокого давления при промывке грунтов для вытеснения нефти может уничтожить микробные популяции, в то время, как химические сорбенты и диспергаторы могут оказывать негативное действие на окружающую среду в целом [1]. Поэтому среди мер, предпринимаемых с целью охраны окружающей среды от подобных загрязнений, важное место занимает биоремедиация, основанная на способности отдельных микроорганизмов к деградации нефти и нефтепродуктов [2]. Эффективность процесса очистки зависит от ряда факторов, в том числе от правильного выбора микроорганизма-деструктора. Для ликвидации региональных нефтезагрязнений предпочтительнее использование микроорганизмов – деструкторов нефти, адаптированных к условиям загрязнения конкретными нефтепродуктами [3].

**Цель работы** – изучение микрофлоры образцов почвы и речной воды, загрязненных нефтепродуктами, и выделение штаммов микроорганизмов, устойчивых к нефтяным загрязнениям.

**Методы исследования.** Отбор образцов загрязненной почвы проводили в районе Ванкорского нефтегазового месторождения (Туруханский район); контрольные образцы условно чистой почвы отбирали в районе Заповедника «Столбы» (г. Красноярск). Отбор образцов воды из р. Енисей проводили в черте г. Красноярска в районе нефтебазы и пос. Удачный в районе Свято-Успенского монастыря. В работе использовали общепринятые микробиологические методы. Общую численность микроорганизмов определяли на мясопептонном агаре; для выделения микромицетов использовали среду Сабуро. Выделение нефтеокисляющих бактерий проводили на минеральной среде с добавлением стерильной нефти.

**Результаты.** Исследования показали, что в образцах почвы и воды общая численность бактерий и микромицетов варьировала (табл. 1). На загрязненных участках почвы общее количество бактерий было меньше, чем на контрольных и условно чистых участках. Численность микроорганизмов в речной воде возрастала в присутствии нефтепродуктов. При учете микромицетов в почве и воде была выявлена аналогичная закономерность, что и при учете бактерий.

Таблица 1 – Численность микроорганизмов в образцах почвы и воды

Образцы	Количество микроорганизмов	
	Бактерии, $10^5$ КОЕ в 1 г	Микромицеты, $10^2$ КОЕ в 1 г
Загрязненная почва	1,15±0,35	2,5±0,9
Чистая почва	1,50±0,47	3,9±1,1
Загрязненная вода	1,00±0,26	1,9±0,8
Чистая вода	2,00±0,41	2,4±0,9

Из почвенных образцов выделено 9 штаммов нефтеокисляющих бактерий; из речной воды – 11 штаммов. При этом микроорганизмы, способные к росту на среде с нефтью, были обнаружены как на загрязненных территориях, так и на контрольных участках. Это свидетельствует о присутствии в окружающей среде микроорганизмов, потенциально способных к ассимиляции нефтепродуктов, и перспективных для применения в биоремедиации.

**Заключение.** Сравнительный анализ загрязненных и контрольных образцов почвы и воды показал, что численность микроорганизмов под воздействием нефтепродуктов снижается. Это свидетельствует о негативном влиянии углеводородов на микрофлору. Для уменьшения негативного эффекта необходимо проводить биоремедиационные мероприятия, в том числе вносить биопрепараты на основе углеводородокисляющих бактерий.

### Литература

1. Глянцева Ю.С., Зуева И.Н., Чалая О.Н., Лифшиц С.Х. Вопросы экологического мониторинга и реабилитации нефтезагрязненных почв арктической зоны Якутии // Арктика и Север. – 2012. – №. 5. – С. 1-12.
2. Бабаев Э.Р., Мамедова П.Ш., Кулиева Д.М., Мовсумзаде М.Э. Выбор активного микроорганизма деструктора углеводородов для очистки нефтезагрязненных почв Балаханского месторождения // Башкирский химический журнал. – 2009. – Т. 16. – №. 1. – С. 103-106.
3. Белоусова Н. И., Барышникова Л. М., Шкидченко А. Н. Отбор микроорганизмов, способных к деструкции нефти и нефтепродуктов при пониженных температурах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – №. 5. – С. 513-517.

## САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ САПРОПЕЛЕВЫХ ГРЯЗЕЙ ОЗЕРА ПЛАХИНО (БОРОВОЕ)

А.А. Серeda

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

*E-mail: nensi.sereda@mail.ru*

Сапропель, или лечебная грязь, озера Плахино (Боровое) – высокоэффективный лечебный продукт природного происхождения. Его лечебные свойства обусловлены редким

сочетанием органических веществ: витаминов, ферментов, гормоноподобных веществ, гуминовых соединений, липидов, природных антибиотиков. В формировании сапропеля и образовании биологически активных веществ важную роль играют микроорганизмы. В результате деятельности микроорганизмов образуется так называемый «летучий комплекс» – сероводород, летучие аминные основания, производные аммиака, который обладает наибольшей способностью проникать через неповрежденную кожу. Присутствие нежелательной микрофлоры, условно-патогенных или патогенных микроорганизмов, может иметь негативные последствия при использовании сапропеля для грязелечения или в составе парфюмерно-косметической продукции. Поэтому важной задачей является контроль микробиологической безопасности сапропеля [1, 2].

**Цель работы** – проведение санитарно-бактериологического анализа сапропеля озера Плахино (Боровое) для оценки возможности его применения в косметической продукции.

**Объекты и методы:** Объектом исследования были образцы сапропеля, отобранные в районе озера Плахино (Боровое) в Абанском районе Красноярского края в 2017-2018 гг. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий (МАФAM), санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ), бактерий группы кишечной палочки (БГКП), дрожжей и дрожжеподобных плесневых грибов проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.801-99 [3].

**Результаты.** Исследования показали, что ни в одном образце сапропеля не были обнаружены СПМ видов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*; количество дрожжевых, дрожжеподобных и плесневых грибов составляло менее 10 КОЕ/г во всех образцах сапропеля, что соответствовало санитарным нормам. Количество МАФAM и БГКП в исходных образцах превышало допустимое количество и увеличивалось в результате гомогенизации сапропеля. Для уменьшения количества микроорганизмов проводили пастеризацию образцов при температуре 60 °С в течение 20 минут. Это позволило полностью подавить рост БГКП и снизить количество МАФAM до 667 КОЕ/г, что соответствовало гигиеническим нормативам. Анализ микробиологической стойкости образцов проводили после выдержки пробирок с образцами сапропеля при температуре 25 °С. В результате, количество МАФAM увеличилось в 10 раз, тогда как остальные показатели соответствовали норме.

**Заключение.** В результате пастеризации количество микроорганизмов в образцах сапропеля озера Плахино (Боровое) уменьшилось до разрешенного уровня, однако этот эффект был кратковременным. Поэтому рекомендовано снижение температуры хранения сапропеля, а также поиск более эффективных способов консервации.

### Литература

1. Платонов, В. В. Ларина, М. А., Дмитриева, Е. Д. Биологически активные медицинские препараты на основе сапропелевого гуминового комплекса //Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2016. – Т. 10. – №. 2. – С. 1-10.
3. Пушкарева, Т. А., Тронова, Т. М., Клопотова, Н. Г., Бородин, М. Г. Сапропели озер Сибири для курортно-рекреационных целей // Материалы 7-й Всероссийской с международным участием научной школы "Болота и биосфера", 13–15 сентября 2010 г., – Томск : Издательство ТГПУ, 2010. – С. 223-227.
4. МУК 4.2.801-99 Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции. Дата введ. 27 декабря 1999 г.

## МИКРООРГАНИЗМЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В КРИОГЕННЫХ ПОЧВАХ СУБАРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ

С. В. Прудникова<sup>1</sup>, С.Ю. Евграфова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный 79, Россия

<sup>2</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 660036, г. Красноярск, Академгородок 50/28, Россия

E-mail: sprudnikova@sfu-kras.ru

Вечная мерзлота составляет до 26% почвенных экосистем Земли и занимает огромные площади территории Сибири, представляя уникальную экологическую нишу для микроорганизмов, адаптированных к холоду [1]. В криогенных почвах встречается значительное количество разнообразных микроорганизмов, преимущественно психротрофных, однако, низкие температуры, короткий вегетационный рост, дефицит поступления субстратов и энергии препятствуют их развитию [2]. В ряде исследований показано, что функциональные микробные экосистемы криогенных почв находятся в метаболически активном состоянии даже в среде вечной мерзлоты и играют важную роль в глобальных биогеохимических процессах [2, 4]. При этом микробные сообщества мерзлотных почв остаются малоизученными, в том числе не изучен их вклад в биодеструкционные процессы сложных органических веществ и полимерных материалов. Низкие температуры окружающей среды значительно снижают ферментативную активность микроорганизмов. Однако, изменения климата, способствующие повышению активности микробных ферментов в вечной мерзлоте, могут привести к ускорению деструкции органического вещества и увеличению выбросов парниковых газов [1].

**Цель работы** – оценка биодеструктивной способности микробного сообщества криогенных почв Центральной Эвенкии в отношении биоразрушаемых полимеров – полигидроксиалканоатов (ПГА).

**Методы исследования.** Эксперимент проводили на базе Эвенкийского стационара Института леса имени В.Н. Сукачева СО РАН (п. Тура, 64°18'; 100°11'). Тип почвы классифицируется как гомогенные криоземы. Образцы пленок из высокоочищенного гомополимера поли-3-гидроксибутирата (П(ЗГБ)) были получены в Институте биофизики СО РАН. Пленки экспонировали в почве в природных условиях на территории стационара в течение 15 месяцев, а также в лабораторных условиях при пониженной температуре (4 °С) в течение 8 месяцев. По окончании экспозиции проводили микробиологический анализ фоновой почвы и соскобов с поверхности полимерных пленок. Общее микробное число (ОМЧ) определяли на мясопептонном агаре, численность бактерий-деструкторов ПГА – на минеральном агаре с добавлением полимера П(ЗГБ). Идентификацию почвенных бактерий проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI Biotyper), идентификацию бактерий-деструкторов – методом секвенирования последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК.

**Результаты.** Исследования показали, что ОМЧ фоновой почвы составляло  $1,9 \pm 0,1$  млн. КОЕ/г в условиях стационара и  $1,6 \pm 0,1$  млн. КОЕ/г – в лабораторных условиях. На поверхности полимерных пленок наблюдали рост численности бактерий до  $4,5 \pm 1,4$  и  $1,1 \pm 0,1$  млн. КОЕ/г в природных и лабораторных почвах, соответственно. Не смотря на высокую численность микроорганизмов, убыль массы образцов пленок П(ЗГБ) была крайне незначительна при низких температурах и за время экспозиции составила 2,4% в почвах стационара и 3,7% – в лабораторных условиях. Изучение сообщества микроорганизмов-деструкторов П(ЗГБ), обладающих ферментами-деполимеразами, показало, что их

численность составляла в среднем 4,3 % от общей численности бактерий фоновой почвы и возрастала до 28,7 % в соскобах с поверхности полимерных пленок. Анализ таксономического состава криогенных почв эвенкийского стационара выявил доминирование в фоновой почве представители филума *Actinobacteria* и рода *Bacillus* (рис. 1А). Сообщество бактерий-деструкторов отличалось по спектру представителей, однако среди доминирующих были идентифицированы те же таксоны (рис. 1Б).

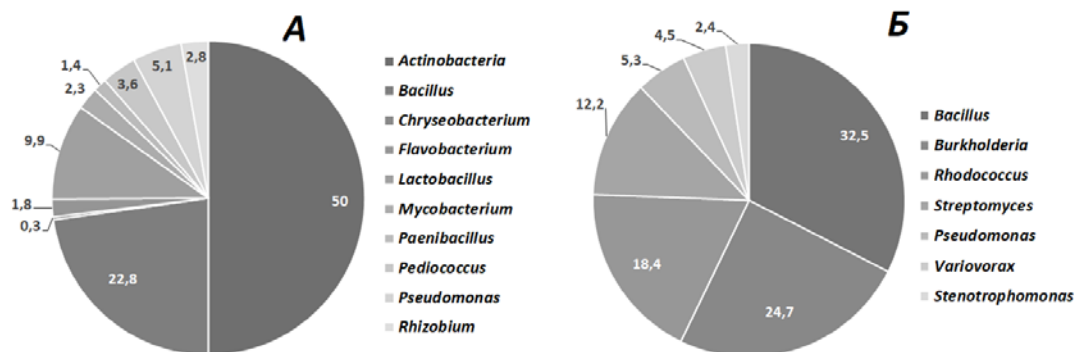


Рисунок 1 – Таксономическое разнообразие микрофлоры криогенных почв эвенкийского стационара: А – микрофлора фоновой почвы, Б – сообщество бактерий-деструкторов П(ЗГБ)

Филогенетический анализ показал, что среди бактерий-деструкторов преобладали (более 60 % штаммов) бактерии рода *Bacillus* и актинобактерии родов *Rhodococcus* и *Streptomyces*. Из грамотрицательных бактерий были определены *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Variovorax* и *Stenotrophomonas* (рис. 2).

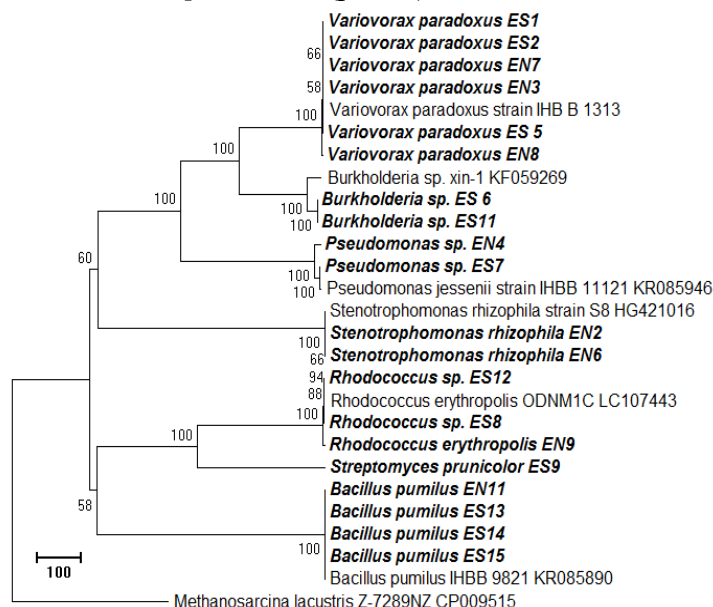


Рисунок 2 – Филогенетическое древо, построенное на основе последовательностей гена 16S рРНК бактерий-деструкторов ПГА

**Заключение.** Полученные результаты указывают на наличие микробного потенциала к биодegradации П(ЗГБ) в криогенных почвах и селективное действие полимера как субстрата на микробное сообщество в сторону увеличения микроорганизмов-деструкторов.

### Литература

1. Jansson, J. K., Taş, N. The microbial ecology of permafrost // Nature Reviews Microbiology. – 2014. – 12(6). – P. 414.

2. Rivkina, E., Laurinavichius, K., McGrath, J., Tiedje, J., Shcherbakova, V., Gilichinsky, D. Microbial life in permafrost // *Advances in Space Research*. – 2004. – 33(8). – P. 1215-1221.

3. Steven, B., Leveille, R., Pollard, W. H., Whyte, L. G. Microbial ecology and biodiversity in permafrost // *Extremophiles*. – 2006. – 10(4). – P. 259-267.

## РАЗРУШАЕМОСТЬ СМЕСОВЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА В ПОЧВЕ

**В. Афанасьев, А. Гвоздев**

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

*E-mail: kokoc881188@mail.ru*

При разработке препаратов для защиты культивируемых растений от вредителей, сорняков и возбудителей болезней большое значение имеет выбор материала, используемого в качестве основы для депонирования действующих веществ. Материал должен обладать комплексом специальных свойств, среди которых обязательными являются: разрушаемость, экологическая совместимость с окружающей средой и глобальными биосферными круговоротными циклами; безопасность для живой и неживой природы; длительная сохраняемость в природной среде и контролируемая деструкция с образованием нетоксичных продуктов; химическая совместимость с препаратами; возможность переработки доступными способами, совместимыми с технологиями изготовления пестицидов и удобрений. Для этих целей используют и исследуют различные материалы природного и синтетического происхождения, среди которых – полимеры в чистом виде, а также с добавками низкомолекулярных компонентов, включая глины и глиноподобные силикаты, производные целлюлозы, лигнин, хитозан и др. Активно исследуемое в настоящее время направление – это смесевые и композитные системы на основе разрушаемых полимеров, – полилактида, полигликолида, поли-ε-капролактона, полиэтиленгликоля. При разработке с/х препаратов на основе разрушаемых материалов первостепенное значение приобретает вопрос о закономерностях разрушения в природных условиях, прежде всего, в почвах.

**Цель работы** – исследование разрушаемости смесовых форм на основе П(ЗГБ) в лабораторных условиях в почве.

**Материалы и методы.** Образцы смесовых форм в виде таблеток и гранулята, разработанные из смесей разрушаемого П(ЗГБ) с природными материалами (глина, березовые опилки, торф), исследованы при экспонировании в агропреобразованной почве полевого стационара «Миндерлинское» Красноярского государственного аграрного университета), лесостепь (56° северной широты, 92° восточной долготы) the Krasnoyarsk Territory, Siberia, Russia. Это чернозем тяжелосуглинистого гранулометрического состава, плотность от 0,80 до 1,24 г/см<sup>3</sup>; рН 7,3 с высоким содержанием аммонийного (35 мг/кг) и нитратного (9,2 мг/кг) азота. Содержание фосфора составляло 280; калия 250 мг/кг. В контейнеры с почвой помещали предварительно взвешенные образцы таблеток и гранул, упакованные в чехлы из мелкоячеистого мельничного газа, по 1 образцу в каждом контейнере. Контейнеры инкубировали в термостате при постоянной температуре 21,0±0,1°С и влажности почвы – 50%. Длительность эксперимента составляла 35 суток, уменьшение массы образцов определяли в динамике. Влажность почвы и рН в ходе эксперимента поддерживали на заданном уровне. Динамику убыли массы образцов определяли гравиметрически. Так, образцы после изъятия из почвы отмывали от земли

дистиллированной водой, помещали в термостат при 40 °С на 24 ч для высушивания до постоянного веса и взвешивали на аналитических весах (Mettler Toledo, Швейцария).

**Результаты.** В связи с тем, что полученные смеси рассматриваются в качестве матрикса (наполнителя) для препаратов, предназначенных для грунтового применения, исследована динамика их разрушения в почве по сравнению с чистым полимером. На рис. 1 представлено фото внешнего вида форм, разрушающихся в течение 35 сут. в агропреобразованной (полевой) почве; на рис. 2 – кинетика разрушения образцов.

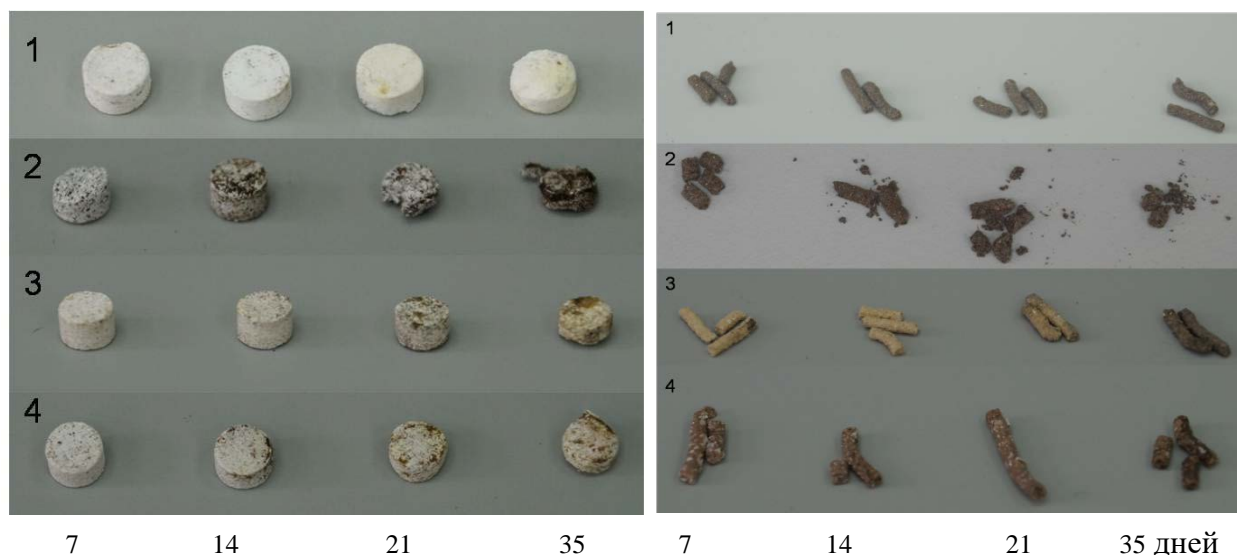


Рисунок 1 – Фото смесевых образцов в ходе разрушения при экспозиции в почве: 1 – П(ЗГБ), 2 – П(ЗГБ)/торф; 3 – П(ЗГБ)/опилки; 4 – П(ЗГБ)/глина

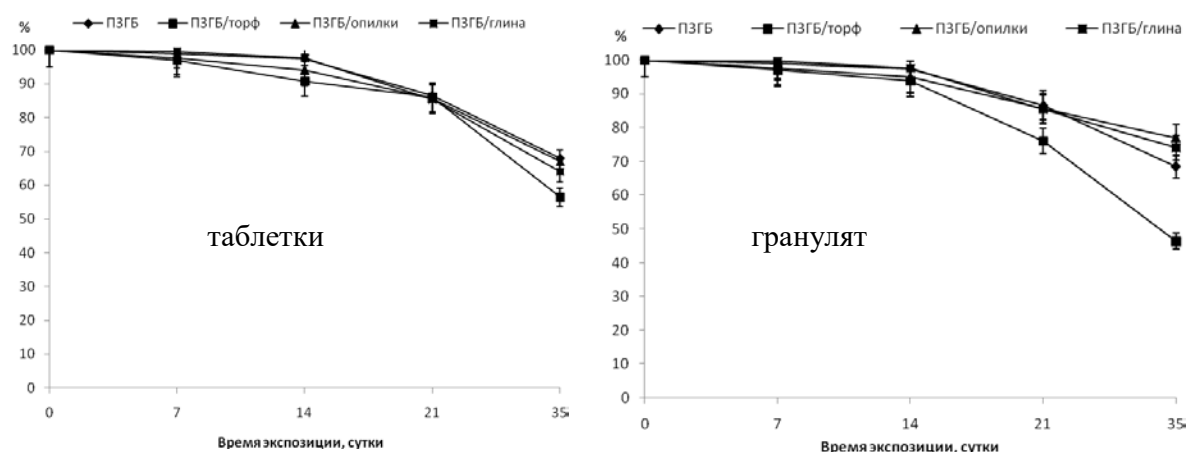


Рисунок 2 – Динамика разрушения смесевых форм в лабораторных условиях в почве

Обе формы разрушались в почве в исследованных условиях с близкими скоростями. Согласно представленному графику (рис. 2), более активная биodeградация полимерных образцов происходила, начиная с 3 недели экспозиции в почве и практически не зависела от материала наполнителя. В конце эксперимента (35 суток) остаточная масса таблетированных форм составила для чистого П(ЗГБ) 68%, смеси П(ЗГБ)/торф 56,4%, П(ЗГБ)/опилки 67%, П(ЗГБ)/глина 64%. Для гранулированных форм динамика потери массы образцов была

сходной (рис. 2). В конце эксперимента остаточная масса гранул составила из чистого П(ЗГБ) – 68,4%; для П(ЗГБ)/торф – 46,4%; П(ЗГБ)/опилки – 77%; П(ЗГБ)/глина – 74%.

**Заключение.** Все типы смесовых форм, независимо от геометрии (таблетки или гранулы), разрушались в почве с близкими показателями, достаточно медленно в течение первых двух недель, и более активно, начиная с 3-й недели. За 35 суток потеря массы образцов не превышала 40-50%. Это позволяет положительно оценить разработанные смесовые формы в качестве основы для депонирования и длительной доставки грунтовых препаратов высшим растениям.

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

## **ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДРЕВЕСИНЫ *PINUS SIBIRICA*, ПОРАЖЁННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВОДЯНКОЙ, НА РОСТ И РАЗВИТИЕ СЕМЯН *PINUS SYLVESTRIS***

**И.Д. Гродницкая<sup>1</sup>, Н.А. Муштукова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН*

<sup>2</sup>*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск*

*E-mail: igrod@ksc.krasn.ru*

**Ключевые слова:** бактериальная водянка, эндофитные микроорганизмы, семена сосны обыкновенной.

Бактериальная водянка лесных пород – широко распространенный системный бактериоз, протекающий обычно в хронической форме, поражающий многие лиственные и хвойные древесные породы. Симптоматика бактериоза связана с обводнением ядровой и заболонной древесины стволов, с трещинами и раковыми ранами стволов и ветвей; для хвойных характерна также засмоленность пораженных тканей [1].

По степени лесохозяйственной вредности бактериальную водянку относят к бактериозу № 1 в лесах России. Однако вопрос об истинном возбудителе этого заболевания до сих пор остаётся открытым как в России, так и за рубежом. Ряд исследователей считает, что в развитии патогенеза могут принимать участие ассоциации различных микроорганизмов, в том числе и непатогенных [2]. В связи с этим весьма актуальными становятся исследования по выделению и идентификации изолятов эндофитных микроорганизмов, для дальнейшей их проверки на патогенность путем искусственного заражения семян хвойных.

**Цель работы** – оценить влияние эндофитных бактерий, выделенных из «мокрой древесины» пораженных кедров, на рост и развитие семян сосны обыкновенной.

**Методы исследования.** Из образцов древесины кедровых сосен (керы, спилы), поражённых бактериальной водянкой, отобранных в Слюдянском лесничестве Иркутской области, выделено в чистые культуры 25 эндофитных изолятов бактерий. С помощью молекулярно-генетического анализа выделена их геномная ДНК, проведены амплификация гена 16S рРНК и секвенирование ДНК изолятов (по Сэнгеру). Для проверки влияния эндофитных бактерий на рост и развитие хвойных проведен вегетационный опыт (*in vitro*). Семена сосны обыкновенной (II класс всхожести) обрабатывали водными суспензиями эндофитных бактерий ( $10^7$  кл/мл) и засевали в пластиковые кюветы с садово-парковой почвой, в контроле семена замачивали в стерильной воде. Всего было семь вариантов опыта



(по три повторности). Учитывали всхожесть семян и развитие проростков в течение 30 дней. С помощью классических микробиологических методов проведена оценка изменения в составе эколого-трофических групп микроорганизмов в образцах почвы под посевами семян в зависимости от варианта опыта.

**Результаты:** по результатам секвенирования идентифицировано 6 родов бактерий: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rouxiella*, *Ewingella*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacterium*.

Наибольшее влияние на всхожесть семян сосны обыкновенной оказала обработка штаммом р. *Brevibacterium* – увеличение на 12 % по сравнению с контролем. Обработка семян сосны штаммами рр. *Bacillus*, *Rouxiella*, *Paenibacillus* увеличила всхожесть семян на 3-9%. Бактерии рода *Stenotrophomonas* не оказали влияния на всхожесть семян, а в варианте с р. *Ewingella* отмечено уменьшение количества проростков на 15,1%. Морфометрический анализ проростков сосны обыкновенной показал, что бактерии рр. *Bacillus* и *Rouxiella* значительно увеличивали длину стебля (на 31,7% и 20,3%) и мутовки (на 33,7% и 18%) по сравнению с контролем. Существенное уменьшение длины корня по сравнению с контролем отмечено в вариантах обработки рр. *Paenibacillus* (на 29,4%), *Ewingella* (на 17,3%), *Brevibacterium* (на 11,7%).

Во всех образцах почвы, с обработанными бактериями семенами сосны, наблюдали увеличение общего микробного числа в 1,2 – 3,2 раза, по сравнению с контролем. Отмечено, что численность амилитического комплекса микроорганизмов увеличивали бактерии рр. *Bacillus*, *Ewingella*, *Brevibacterium* в 1,4-1,7 раз относительно контроля. Увеличение количества гидролитиков (в среднем, в 4 раза) в почве отмечено в вариантах с рр. *Stenotrophomonas*, *Bacillus* и *Ewingella*. Количество олиготрофных микроорганизмов увеличилось, по сравнению с контролем, во всех вариантах опыта, с р. *Ewingella* – в 5,3 раза, с остальными бактериями – в 1,5-3,5 раза.

**Заключение.** Установлено неоднозначное влияние исследуемых штаммов эндофитных бактерий на рост семян и развитие проростков сосны обыкновенной. На всхожесть семян сосны стимулирующее действие (в разной степени) оказали 4 штамма бактерий из 6. Обработка семян всеми штаммами бактерий привела к улучшению развития надземной части проростков и торможению развития подземной части (корня). Отмечено, что в почве под посевами сосны обыкновенной внесенные бактерии сохраняли жизнеспособность в течение 30 суток и способствовали повышению общей численности микроорганизмов.

#### Литература

1. Черпаков, В.В. Бактериальная водянка: поражаемые виды хвойных пород России [Текст] / В.В. Черпаков // Актуальные проблемы лесного комплекса.- 2012. – Вып. 33. – С.111–115.
2. Черпаков, В.В. Этиология бактериальной водянки древесных растений [Текст] / В.В. Черпаков // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2017. – № 220. – С. 125-139.

## АНАЛИЗ СХОДСТВА ПОПУЛЯЦИЙ *CORYDALIS BRACTEATA SENSU LATO*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЮЖНОЙ ЧАСТИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ

К.К. Рябова

Сибирский федеральный университет, Свободный пр., 79 корпус 4, Красноярск, Россия

E-mail: Ryabova.kseniya.k@mail.ru

Проблема рационального природопользования базируется на сохранении видового разнообразия. Накопление информации в этой области обеспечивается новыми методиками работы с генетическим разнообразием. Однако изученность многих редких видов еще недостаточна и не обеспечивает решения задач по их интродукции и охране. Особенно это касается растений – эфемероидов, которые, в силу своей неконкурентоспособности, предпочитают короткий вегетационный период сразу после таяния снега. Примером таких растений в Красноярском крае является желтоцветковый вид хохлаток *Corydalis bracteata* s.l., который является лекарственным и декоративным растением. К тому же существуют многочисленные проблемы, связанные с систематикой желтоцветковых видов р. *Corydalis*.

**Цель работы:** сравнительный морфолого-генетический анализ популяций *Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers. SENSU LATO в южной части Красноярского края.

Исследования проводили в пределах Красноярской лесостепи (Емельяновский район), северо-западной части Восточного Саяна (Березовский район) и северо-восточной части Западного Саяна (Ермаковский район). Объектом явились 12 популяций *Corydalis bracteata*.

**Результаты:** Выявлено, что данный вид предпочитает увлажненные местообитания: пихтовые, еловые, смешанные леса, субальпийские луга, а также поймы рек и ручьев. Большинство морфометрических признаков характеризуются средним и высоким уровнями изменчивости, согласно шкале С.А. Мамаева [1]. Как отмечает Б.М. Миркин [2], гетерогенность популяций повышает интенсивность использования ресурса и является поводом для процессов микроэволюции, которые наиболее выражены в неблагоприятных условиях произрастания.

Для выявления сходства популяций и нахождения таксономически значимых признаков хохлаток использовался метод главных компонент. Установлено, что диагностическими признаками, позволяющими разделить популяции *C.bracteata* являются: форма прицветника; расположение листа на стебле; форма листовой пластинки; наличие и форма клубенька в пазухе прикорневого листа, которые варьируют в зависимости от условий местообитания хохлатки.

При проведении кластерного анализа установлено, что изучаемые популяции распадаются на три кластера по географическому принципу: красноярские лесостепные, западносаянские низко- и среднегорные, западносаянские высокогорные (рисунок).

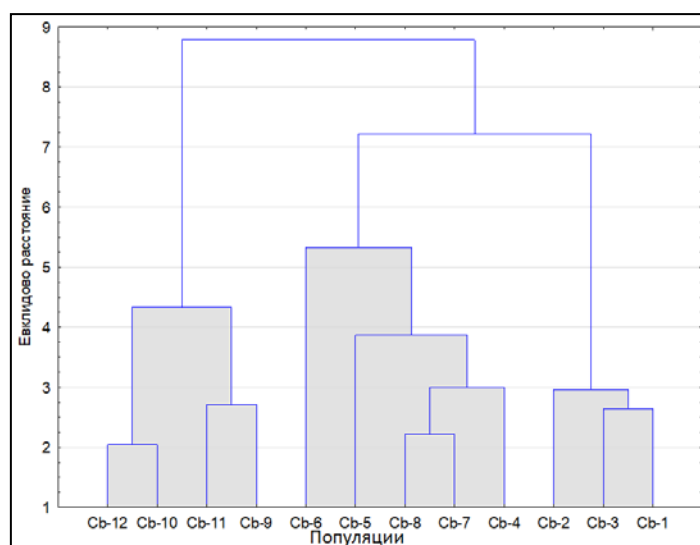


Рисунок – Дендрограмма сходства популяций *C.bracteata*: высокогорные западносаянские Сб-12, Сб-10, Сб-11 Сб-9; восточосаянские и среднегорные западносаянские Сб-6, Сб-5, Сб-8, Сб-7, Сб-4; произрастающие в пределах Красноярской лесостепи Сб-2, Сб-3, Сб-1

Высокогорные западносибирские популяции характеризуют короткие осевые органы, мелкие овальные прицветники, длина которых превышает ширину в 1,5 раза, мелкие листья, короткие цветоножки, редко встречающиеся мелкие клубни в пазухе прикорневого листа, близко расположенные цветки на цветоносе, высоко расположенные листья.

Для низко- и среднегорных западносибирских популяций характерны особи с длинными стеблями, крупными вытянутыми прицветниками, длина которых превышает ширину в 2 раза, большим количеством цветков на цветоносе, широкой листовой пластинкой среднего листочка сложного листа и наиболее вытянутыми черешками нижнего листа. Клубеньки встречаются наиболее часто и обладают максимальными размерами.

Популяции, произрастающие в пределах Красноярской лесостепи, характеризуются средней длиной стебля, но большим количеством цветков, прикорневая чешуя длинная, наличие клубенька варьирует, нижний лист расположен высоко, прицветник вытянутый, листовая пластинка среднего листочка – широкая.

На следующем этапе исследований выполнен подбор праймеров для проведения генетического анализа популяций. Использовался ISSR-метод. Выявлено, что максимальное количество фрагментов ДНК (14-16) синтезируется при использовании праймеров HB11, HB12, HB13, HB14. Наибольший полиморфизм длин фрагментов ДНК проявляется при использовании праймеров 17898B, 17899B, HB10, HB11 и HB14.

#### Литература

1. Мамаев С. А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. Москва: Наука, 1972. 284с.
2. Миркин Б.М. Что такое растительные сообщества. Москва: Наука – 1986.- 164 с.

## ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЯГОД ЖИМОЛОСТИ ГОЛУБОЙ

Н.Ю.Теплюк

*Сибирский федеральный университет, Торгово-экономический институт, г. Красноярск,  
ул. Л.Прушинской, 2, Российская Федерация*

*E-mail: teplyukn24@mail.ru*

Жимолость голубая (*Lonicera caeruleae* L., сем/Жимолостные – *Caprifoliaceae*) – кустарник. Ареал жимолости голубой включает в себя всю умеренную зону северного полушария: Дальний Восток, Сибирь, Северный Китай, Среднюю Азию, Кавказ и распространяется до северных районов Северной Америки [1]. Плоды жимолости характеризуются устойчивым, стабильным плодоношением, их запасы на территории Красноярского края достаточны для промышленных сборов. Вследствие широкого распространения жимолости и использования в лечебных и пищевых целях на фоне противоречивости данных [3] и слабой изученности биохимического состава, актуальны исследования химического состава этой ценной ягоды, произрастающей в Красноярском крае.

**Цель работы** – исследование химического состава плодов жимолости.

**Материалы и методы.** Материал для исследования был собран в трех природных популяциях жимолости, растущей в различных зонах Красноярском крае. В каждой популяции отбирали по 30 особей методом случайной выборки и с каждой из них брали не менее 100 г зрелых плодов для исследований биологически активных веществ.

Результаты химического анализа ягод приведены в табл.

Таблица – Химический состав ягод *Lonicera caeruleae* из трех популяций Красноярского края (в мг/100 г сырых ягод)

Место сбора	Витамин С	Железо	Фосфор	Пектин	Прото-пектин	Каротин
Верхняя Бирюса	4,04	4,38	31,1	257,3	239,4	0,6
Минино	5,38	4,64	16,5	248,0	195,7	0,4
Козулька	5,34	3,03	26,8	357,8	182,5	0,5
Таежное	4,10	3,0	26,5	330,2	210,0	0,4

**Заключение.** Выявлены различия по содержанию ряда химических веществ в ягодах различных природных популяциях жимолости, по всей видимости, связанных с различиями почвенно-климатических условий произрастания, что делает целесообразным проведение генетико-селекционных работ.

### Литература

1. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / ВНИИ лекарств. растений и др. – М.: ГУГК, 1983. – 340 с.
2. Пояркова А.И. Род жимолость – *Lonicera* L // Флора СССР. М.; Л., 1958. – Т. – 23. – С. 419-501.
3. Азин Л.А., Аникина Е.В. Изучение плодов жимолости синей Среднего Урала в связи с возможностью их использования в пищевой промышленности // Вопросы качества и хранения пищевых продуктов: Сборник научных трудов. – Свердловск, 1988. – С. 31-32.
4. Гидзюк И.К. Жимолость со съедобными плодами. – Томск: Издательство Томского университета, 1981. – 168 с.
5. М.А. Шемберг, Е.Н. Шемберг. Использование и структура популяций *Lonicera Pallasii* Ledeb в Средней Сибири. Растительные ресурсы. 1994, №4, С. 29-30.

**Для заметок/For notes**

**Для заметок/For notes**

**Для заметок/For notes**

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

**III-я Международная научная конференция**

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

**III International scientific conference**

**Красноярск**

**30 сентября – 4 октября 2018 г.**

**Материалы конференции**

*Конференция проведена в рамках реализации Программы повышения конкурентоспособности СФУ и мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» – соглашения № 074-02-2018-328 (конкурс для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских вузах и научных организациях по Постановлению правительства РФ от 09 апреля 2010 года № 220; VI очередь) (The conference was financially supported by Project “Agropreparations of the new generation: a strategy of construction and realization” in accordance agreement № 074-02-2018-328 (with Resolution No 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*

Подписано в печать 05.09.2018 г.

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 9,3

Тираж 100 экз. Заказ 521

Отпечатано в типографии И.П. Дворядкина И.Д.  
630036, Красноярск, Академгородок, 50/28, офис 156  
тел. (391) 290-72-32