

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

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

II-я Международная научная конференция

Материалы конференции

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

II International scientific conference

Conference proceedings

**Красноярск
24–29 сентября
2017**

УДК 620.22
ББК 30.600
Б 63

Б 63 II-я Международная научная конференция «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни» / Красноярск, 2017. – 156 с.

ISBN 978-5-906740-07-6

Материалы II-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

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности. Проект № 17-48-241009

ISBN 978-5-906740-07-6

© Сибирский федеральный университет, 2017

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

Программный комитет

1. Татьяна Григорьевна Волова, проф., докт. биол. наук, заведующая базовой кафедрой биотехнологии ИФБиТ СФУ (председатель).
2. Иосиф Исаевич Гительзон, академик РАН.
3. Christopher J. Brigham, Ph.D., Assistant Professor Department of Bioengineering University of Massachusetts Dartmouth, USA.
4. Vasif Hasircı, Prof., Dr BIOMATEN, Center of Excellence in Biomaterials and Tissue Engineering, and Department of Biological Sciences. Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
5. George Guo-Qiang Chen, Prof., Dr. Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Tsinghua University Beijing, China.
6. Михаил Исаакович Штильман, проф., докт. хим. наук, руководитель Учебно-научного центра «Биоматериалы» Российского химико-технологического университета им. Д. И. Менделеева.
7. Михаил Иванович Гладышев, проф., докт. биол. наук, заведующий кафедрой водных и наземных экосистем ИФБиТ.
8. Екатерина Игоревна Шишацкая, проф., докт. биол. наук, заведующая кафедрой медицинской биологии ИФБиТ СФУ.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

Организационный комитет

1. Т.Г. Волова, проф., докт. биол. наук, заведующая базовой кафедрой биотехнологии ИФБиБТ (председатель).
2. Е.И. Шишацкая, проф., докт. биол. наук, заведующая кафедрой медицинской биологии ИФБиБТ.
3. С.П. Шулепина, канд. биол. наук, заместитель директора ИФБиБТ, доцент кафедры наземных и водных экосистем ИФБиБТ.
4. С.В. Прудникова, докт. биол. наук, доцент базовой кафедры биотехнологии ИФБиБТ.
5. Н.О. Жила, канд. биол. наук, доцент базовой кафедры биотехнологии ИФБиБТ.
6. А.Н. Бояндин, канд. биол. наук, доцент базовой кафедры биотехнологии ИФБиБТ.
7. А.М. Шершнева, канд. биол. наук, м.н.с. Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов.
8. Е.Д. Николаева, канд. биол. наук, доцент базовой кафедры биотехнологии ИФБиБТ.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

РАЗДЕЛ 1.

ГЛОБАЛЬНЫЕ ВЫЗОВЫ XXI ВЕКА, РОЛЬ И ПОТЕНЦИАЛ БИОТЕХНОЛОГИИ

ПОТЕНЦИАЛ И ОТВЕТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ НА ВЫЗОВЫ ТЕХНОСФЕРЫ

И.И. Гительзон¹, Т.Г. Волова^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО
РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), г. Красноярск, Академгородок, 50/ 50

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

E-mail: jigitelson@gmail.com

Концепция устойчивого развития, являющаяся основополагающей идеей XXI века, предполагает ведение новых форм хозяйствования, которые обеспечат сокращение темпов потребления не возобновляемых ископаемых видов сырья, сохранив их для будущих поколений, более эффективное использование энергоресурсов, переход на экологически чистые материалы, подлежащие рециклингу, освоение принципиально новых средств и технологий для удовлетворения потребностей человека, включая воспроизводство пищевых ресурсов, освоения новых средств диагностики и терапии, а также для защиты окружающей среды и рационального природопользования.

В результате активной хозяйственной деятельности в настоящее время под угрозой находятся биотические и абиотические компоненты окружающей среды. На фоне роста населения планеты во все более широком масштабе возрастает производство и потребление химических веществ. В связи с этим неуклонно увеличивается количество проблем, связанных с охраной окружающей среды. В результате промышленной, сельскохозяйственной и бытовой деятельности человека возникают различные изменения состояния и свойств окружающей среды, в том числе крайне неблагоприятные. С развитием и интенсификацией промышленной и сельскохозяйственной деятельности в XX веке стали ощущаться пределы естественной продуктивности биосферы, – истощаются природные ресурсы и источники энергии, все более ощущается дефицит пищи, чистой воды и воздуха, во многих регионах загрязнение окружающей среды достигло критического предела. 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. Разработка и освоение новых экологически чистых материалов, обладающих способностью разрушаться в окружающей среде без образования токсичных продуктов, то есть вписываться в глобальные круговоротные циклы, является одним из высокорейтинговых направлений критических технологий XXI века. Связано это с тем, что объемы выпуска синтетических пластмасс превысили 300 млн. тонн в год; их основная часть скапливается на свалках, так как повторной переработке в развитых странах подвергается не более 20 %. Под полигоны и свалки твердых бытовых отходов ежегодно отчуждается до 10 тыс. га земель, в том числе плодородных, изымаемых из сельскохозяйственного оборота. Полиэтиленовый мусор выводит из строя канализационные и дренажные системы городов, загрязняет Мировой океан и снижает качество вод.

Таким образом, традиционное повсеместное применение продуктов химического синтеза, в том числе химических пестицидов и синтетических пластиков, получаемых из невозобновляемых природных ресурсов, приводит к чрезмерному росту количества не утилизируемых отходов, что вступает в противоречие с мероприятиями, направленными на защиту окружающей среды и создает глобальную экологическую проблему. Загрязнение планеты отходами, наряду с интенсивным потреблением природных ресурсов, ведет к

разрушению механизма саморегулирования биосферы с непредсказуемыми последствиями. Академик Н. Н. Моисеев еще в конце 70-х годов прошлого века писал: «Главной проблемой глобальной экологии является устойчивость биосферы, нарушение ее устойчивости практически означает ликвидацию человечества на планете Земля».

Развитие науки и техники приводит к все более широкому внедрению в практику целевых продуктов, синтезируемых в биотехнологических процессах. Многообразие форм живой материи и новые знания в области физики и химии живых систем позволяют конструировать биологические системы различной степени сложности и организации для синтеза широчайшего спектра макромолекул медицинского, пищевого и технического назначения. Разработка и освоение биотехнологии занимают важное место в современном мире. Достижение превосходства в биотехнологии является одной из центральных задач в экономической политике всех развитых стран.

В расширительном толковании биотехнология – это все технологические процессы, в которых используются живые организмы или их компоненты. Но при таком понимании все сельское хозяйство, начиная с самых первобытных его форм, нужно включить в биотехнологию. В точном понимании слова это справедливо, но вряд ли конструктивно, т.к. не содержит в себе ничего нового. Противоположная крайность – ограничить биотехнологию генно-инженерными манипуляциями. Под впечатлением недавно еще немыслимых возможностей воздействовать на геном, буквально – «лепить живые формы», возникла тенденция оставить понятие биотехнология для обозначения только этой, безусловно, самой перспективной и самой быстро развивающейся области прикладной биотехнологии. Но при этом остается за бортом биотехнологии то, что составило ее действительную основу – биотехнологические, главным образом, промышленные микробиологические производства. Если отказаться от обеих крайних позиций, то биотехнологию можно определить по ее основному признаку – управлению биотехнологическими процессами. Согласно этому представлению, биотехнология является наукой о способах получения целевых продуктов с помощью биосинтеза, управляемого параметрами среды или генно-инженерными манипуляциями, либо сочетанием этих воздействий. Таким образом, основой биотехнологии является управляемый биосинтез. Параметрическое управление составляет ее классическое содержание, хотя и в эту область последние десятилетия внесли много нового, в частности, технику непрерывного культивирования микроорганизмов с обратной связью. Важнейшими задачами, стоящими перед биотехнологией сегодня, являются: повышение продуктивности сельскохозяйственных растительных культур и животных, создание новых пород культивируемых в сельском хозяйстве видов, защита окружающей среды и утилизация отходов, создание новых экологически чистых процессов преобразования энергии и получения минеральных ресурсов. Реальная возможность конструирования генома – это достижение сравнительно недавних лет. Перспективы этого направления биотехнологии необозримы. Сочетание генетического и параметрического управления биосинтезом способствует взаимному усилению возможностей этих методологических подходов; их сочетанное использование определит лицо биотехнологии ближайшего будущего.

В настоящее время, когда императивной задачей всей технологической цивилизации становится переход к экологически совместимым, «дружественным природе» технологиям, роль биотехнологии возрастает многократно. Неизбежная переориентация промышленности на безотходные производства делает биотехнологию областью наиболее быстрого развития сегодня и в ближайшем будущем с широким спектром производств – от замещающих генов, гормонов, тканей и органов в медицине до процессов биометаллургии, технологической биоэнергии, воспроизводства целевых продуктов промышленной биотехнологии.

ENGINEERING AT THE NANOSCALE: NEW OPPORTUNITIES FOR DEVELOPING EFFECTIVE FUNCTIONAL MATERIALS

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 field of polymer nanocomposites is stimulating both fundamental and applied research because these nanoscale materials often exhibit physical and chemical properties that are dramatically different from conventional microcomposites. A large number of nano particles, layers silicates and polymeric whiskers are being used in the preparation of nano composites. The polymer/layered nanocomposites can exhibit increased modulus, decreased thermal expansion coefficient, reduced gas permeability, increased solvent resistance and enhanced ionic conductivity when compared to the polymer alone.

Micro and nano bio inspired composite materials are the best future materials for the coming millennium. Cellulose fibers, chitin and starch in different length scales offer outstanding properties like stiffness, toughness and other mechanical properties. Composites from polymers (rubbers and plastics) and reinforcing fibers provide best properties of each. They replace conventional materials in many structural and non-structural applications. Both natural fibers and polymers are light, on combination they give composites of very high strength to weight ratio. In recent years composites made from natural (cellulosic) fibers and organic polymers have gained a lot of interest in construction and automobile industry. Unlike synthetic fibers, natural fibers are abundant, renewable, cheap and of low density. Composites made from natural fibers are cost effective and environment friendly. However, lack of interfacial adhesion and poor resistance to moisture absorption makes the use of natural fibers less attractive for critical applications. However, these problems can be successfully alleviated by suitable chemical treatments.

The field of polymer latex nanocomposites is stimulating both fundamental and applied research because these nanoscale materials often exhibit physical and chemical properties that are dramatically different from conventional microcomposites. A large number of nano particles, layers silicates, CNT and polymeric nanowhiskers are being used in the preparation of latex stage nano composites. Since the Toyota research group's pioneering work on nylon6/layered silicate nano composites, rubber latex nanocomposites containing nanofillers have attracted much attention. The latex nanocomposites can exhibit increased modulus, decreased thermal expansion coefficient, reduced gas permeability, increased solvent resistance and enhanced ionic conductivity when compared to the neat latex alone.

Biodegradable polymer scaffolds are useful materials to integrate the femoral part of the implant with the bone, and provide a matrix for cellular growth. Synthetic biodegradable polymers can provide temporary scaffold for cell adhesion and expansion both in vitro and in vivo and guide tissue regeneration with defined sizes and shapes. The fibrillar structure is important for cell attachment, proliferation and differentiated function in tissue engineering. The structure allows for growth and is convenient for transport of nutrients. The synthetic polymers such as Polycaprolactone (PCL), Poly l-lactic acid (PLLA), and their copolymers have attracted wide attention for their biodegradation in the human body and are used for tissue engineering. Several methods have been practiced to create highly porous scaffold including fiber bonding, solvent casting/ salt leaching, gas foaming, phase separation and electrospinning. Out of which electrospinning is the simple and cost effective technique for producing nanofibers from polymer solution. Introduction of organically modified clay in polymers leads to different types of structures which include intercalated or exfoliated morphology. The nano reinforcement increases the

mechanical rigidity, mobility, stiffness and biodegradability in biodegradable polymers. Moreover it also increases the porosity of the polymer nanocomposite. Nanoparticle reinforced scaffolds are yet to achieve importance. In fact they have wide range of interest in tissue engineering.

In the proposed talk, the different preparation techniques for polymer nanocomposites will be described. The role of various surfactants in improving the polymer/filler interaction will be reviewed. The various characterization techniques for nanocomposites will be addressed. In the case of semi crystalline polymers the role of crystallization on the intercalation and exfoliation will be discussed. Recent developments in cellulose nanocomposites, chitin nanocomposites and starch nanocomposites will be addressed. Finally the state of the art on the synthesis, morphology, structure, properties and applications of dual porous nanocomposite scaffolds will be presented.

NANO-BIOSENSORS FOR BIO-MEDICAL APPLICATIONS

Prof. Kuruvilla Joseph

*Department of Chemistry Indian Institute of Space Science and Technology,
Department of Space, Govt. of India, Valiamala, Thiruvananthapuram-695547, India
E-mail: kuruvila@iist.ac.in or kjoseph.iist@gmail.com*

Nanotechnology is an emerging technology with enormous potential in information and communication technology, biology and biotechnology, medicine and medical technology. It is an umbrella term that is used to describe a variety of techniques to fabricate materials and devices on the nanoscale. It is a capable and promising forthcoming technology with its applications being unlimited, in almost every branch of the sciences. Nanotechnology-enabled sensors will undoubtedly be able to detect, identify, and filter out harmful chemical or biological agents in air and soil with much higher sensitivity than is possible today. Researchers around the world are investigating carbon nanotube “scrubbers,” and membranes to separate carbon dioxide from power plant exhaust. Additionally researchers are exploring particles such as self-assembled monolayers on mesoporous supports, dendrimers, carbon nanotubes, and metalloporphyrinogens to interpret the manner in which they remediate various toxic sites with the help of their unique chemical and physical properties. In the field of medicine, its applications are not less than a magic. The availability of more durable and better prosthetics and new drug-delivery systems are of great scientific interest and give hope for cancer treatment and minimum invasive treatments for heart disease, diabetes and other diseases. One of the most promising societal impacts of nanotechnology is in the area of nanomedicine. Personalized health care, rational drug design, and targeted drug delivery are some of the benefits of a nanomedicine based approach to therapy. Delivery of these molecules to specific areas within the body can be achieved, which will reduce systemic side effects and allow for more efficient use of the drug. Nanostructured drug carriers allow for the delivery of not only small-molecule drugs but also the delivery of nucleic acids and proteins [1-3]. Moreover, new drugs are being approached. The most promising areas of nanomedicine are diagnostics by in vitro imaging and cancer therapies in ovarian cancer by the use of nanoparticles. New approach is its use as therapeutics modalities for infertility. Nanotechnology will serve as multifunctional tools that will not only be used with any number of diagnostic and therapeutic agents, but will change the very foundations of cancer diagnosis, treatment, and prevention. Nanotechnology is applied to the field of cancer in the development of nanovectors, which can be loaded with drugs or imaging agents and then targeted to tumours. Combined technologies can be used for both earlier diagnosis and better treatment for patients with cancer. Nanotechnology is poised to have an increasing

impact on cardiovascular health in coming years [4]. Diagnostically, multiplexed point-of-care devices will enable rapid genotyping and biomarker measurement to optimize and tailor therapies for the individual patient. Nanoparticle-based molecular imaging agents will take advantage of targeted agents to provide increased insight into disease pathways rather than simply providing structural and functional information. Drug delivery will be impacted by targeting of nanoparticles encapsulated drugs to the site of action, increasing the effective concentration and decreasing systemic dosage and side effects. Nanotechnologies and microtechnologies can be merged with biomaterials to generate scaffolds for tissue engineering that can maintain and regulate cell behavior. Also, such technologies can be used to regulate *in vitro* cellular microenvironment to direct stem cell differentiation. Recent developments in the use of nanotechnologies with stem cells have been motivated by the continuous introduction of novel nanotechnology multidisciplinary platforms during the last few years.

References

1. M S Mathew, A Baksi, T Pradeep, K Joseph , *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 81, 68-74
2. V Raj, AN Vijayan, K Joseph, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2015, 5, 33-36
3. V Raj, T Johnson, K Joseph, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 60, 191-194.
4. K Joseph, V Raj, AN Vijayan, K Joseph, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 54, 171-174.

БИОМАТЕРИАЛЫ – ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

М.И. Штильман

*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047,
Москва, Миусская пл., д. 9. Россия.*

E-mail: shtilmanm@yandex.ru

Область создания, исследования и применения биоматериалов, т.е. материалов, изделия и препараты, на основе которых функционируют в условиях взаимодействия с биологическими объектами, в последние десятилетия сформировалась в важное направление, играющее во многих случаях ключевую роль в решении задач наук и технологий, оптимизирующих жизнедеятельность человека, объединяемых понятием *life science sand technology* – медицины, биотехнологии, косметической и пищевой промышленности, сельского хозяйства и др. [1].

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

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

Литература

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

THE POTENTIAL OF METABOLIC ENGINEERING FOR DEVELOPMENT OF EFFICIENT PRODUCERS OF BIOPOLYMERS

Christopher Brigham

*Department of Bioengineering, University of Massachusetts Dartmouth, 285 Old Westport Road,
North Dartmouth, MA*

E-mail: cbrigham@umassd.edu

Introduction. The ultimate goal for any biomanufacturing system is to maximize productivity while minimizing cost. In the scientific literature, many groups have devised methods of engineering biocatalysts to increase productivity of a value-added compound. However, a significant percentage of these methods simply involve adding or removing genes in a host organism, followed up by very little physiological or biochemical work. With the advances in molecular biology and genetic engineering technologies, there are multiple methods that can be employed, alone and in concert, to optimize industrial microbial strains. The method of optimization to be used depends on the molecule being produced and the microbial chassis used to produce it. In the era of computation, big data and “omics” technologies, the microbial strain engineer can utilize genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic data to inform the construction of an optimal biocatalyst. Indeed, a rigorous understanding of the biology and physiology of an engineered industrial microbe is essential for efficient production strain engineering.

Thus, it is advantageous to gather biological and biochemical data on the microbial chassis to be used in production. These data will aid in understanding of the metabolic pathways that are expressed in the organism and how the products and intermediates are distributed among the cellular pathways. How these data can be used to improve production depends on the system being utilized. For example, if the product molecule is naturally produced by the biocatalyst (e.g., polyhydroxyalkanoate [PHA] synthesis by *Cupriavidus necator*), then the goal is to manipulate the organism and growth/production conditions to improve the overall product titer. Useful biopolymers have been produced in this fashion [1], and pilot-scale production of biopolymer has been successfully executed. In this case, the production organism is first manipulated genetically, with the aim of making the production pathway more efficient. The organism is then cultivated under controlled conditions to produce the optimal amount of biomass, followed by synthesis of product compound with the highest possible titer. The challenge is greater if the product molecule is to be produced by a non-native organism (e.g., PHA production by a heterologous host like *Escherichia coli*). The heterologous production pathway must be efficiently integrated into the metabolism of the host strain. Typically, initial product yield of a heterologous production system is very low.

Regardless of whether the production system is native or heterologous in origin, productivity can be increased by using the various biological and biochemical data to inform efforts on how to «streamline» the host. Analyzing carbon flux, metabolic control and key component interactions can provide important insight into engineering host metabolic pathways to work seamlessly for high-yield production of value-added molecules.

Aim – metabolic engineering concepts will be introduced and applied to the microbial synthesis of PHA biopolymers. Key interactions and pathway fluxes are analyzed and discussed.

Materials and Methods. *Ralstonia eutropha* (now known as *Cupriavidus necator*) strain H16 and derivatives are examined in this study. Prior data on interactions among PHA granule - associated proteins and regulatory factors (examples include [2, 3]) are used to produce an “interactome” map of the *R. eutropha* PHA granule. Fermentation data [4, 5] were examined for metabolic flux analysis of PHA production under different cultivation conditions.

Results. A multitude of proteins have been shown to be associated with the PHA granule in *R. eutropha*. Examination of the academic literature shows the nature of the interactions of key factors like PhaC, PhaP1, PhaR, and others. Using these data, a metabolic network interaction map (an “interactome” map) has been assembled, which demonstrates key interactions in PHA homeostasis in *R. eutropha*. Proteins and enzymes like PHA synthase (PhaC), phasin PhaP1, PHA depolymerase PhaZ1, regulatory protein PhaR are shown to be keystones in this interaction map; that is, eliminating one of these factors or altering how it interacts with other key factors can significantly affect the PHA cycle. Further characterization of lesser-known granule- associated proteins can help inform the interaction model.

PHA metabolic pathway stoichiometry and fermentation data were used for metabolic flux analysis in *R. eutropha*. In order to model carbon flux through the aforementioned pathways under growth and PHA production conditions, we need a rigorous set of measurements, which would include rate of utilization of carbon source, rate of secretion of by-products and rate of synthesis of PHA. Examination of growth on organic acids demonstrates differing carbon flux patterns through PHA synthesis and central metabolic pathways, depending on whether the carbon chain of the acid contains an even or an odd number of carbons.

Conclusion. *R. eutropha* PHA production represents an ideal teaching tool for studying metabolic engineering in microorganisms. Since PHA synthesis is directly tied into central metabolism, we can achieve an understanding of how the polymer synthesis fits in with the basic metabolic processes of the cell. This link to central metabolism is also advantageous if a metabolic control analysis were to be performed. Recently, we have shown that the stringent response exerts some level of control on PHA homeostasis [6]. With metabolic control analysis of PHA biosynthesis conditions, we can observe which enzymes in the pathway are most affected by changes that trigger the switch from growth to polymer production.

References

1. Riedel SL, Bader J, Brigham CJ, Budde CF, Yusof ZA, Rha C, et al. Production of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol Bioeng* 2012 Jan; 109(1):74-83.
2. Pfeiffer D, Wahl A, Jendrosseck D. Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol Microbiol* 2011 Nov; 82(4):936-951.
3. Potter M, Steinbuchel A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 2005 Mar- Apr; 6(2):552-560.

4. Yu J, Wang J. Metabolic flux modeling of detoxification of acetic acid by *Ralstonia eutropha* at slightly alkaline pH levels. *Biotechnol Bioeng* 2001 Jun 20; 73(6):458-64.
5. Yu J, Si Y. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short chain fatty acids. *Biotechnol Prog* 2004 Jul-Aug; 20(4):1015-1024.
6. Jüngert JR, Borisova M, Mayer C, Wolz C, Brigham CJ, Sinskey AJ, et al. Absence of ppGpp Leads to Increased Mobilization of Intermediately Accumulated Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 2017 Apr 28.

SEAWATER BASED BIOTECHNOLOGY FOR PHA PRODUCTION

George Guo-Qiang Chen

School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

E-mail: chengq@tsinghua.edu.cn

Industrial biotechnology cannot compete with the petrochemical industries as it suffers from high consumptions on energy and freshwater, discontinuous processing, low product concentration and thus high product recovery cost as well as low substrate to product conversion efficiency. Therefore, to make industrial biotechnology competitive, we need develop fermentation platform technology which is energy and fresh water saving and run in a continuous way instead of a batch way. Seawater based fermentation technology has been developed based on *Halomonas* spp. We have been able to assemble several multiple genes containing pathways in *Halomonas* spp. for production of various biopolymer molecules. The growth patterns of the *Halomonas* spp. have been changed to influence the shapes of *Halomonas* spp. from short rods to long fibers, even further to large spheres, allowing more PHA accumulation and easy product recovery. The technology has been pilot tested in industrial setting; it has been proven to be able to reduce PHA production cost at least 100%. The seawater technology should be able to improve the economic competitiveness of industrial biotechnology. We expect the technology can play an increasingly important role in the fermentation industries.

BIOMEDICAL APPLICATIONS OF NANO-SIZED POLYMERIC MICELLES AND POLYION COMPLEXES

Alexander Kabanov^{1,2}

¹*University of North Carolina at Chapel Hill, 125 Mason Farm Road
Chapel Hill, NC 27599-7362 USA*

²*M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 117298, Russian Federation,
E-mail: kabanov@email.unc.edu*

The lecture will provide a high-level overview of the use of polymeric micelles, polyion complexes, cell mediated drug carriers and exosomes in the therapy of cancer and neurodegenerative diseases. The speaker will try to combine the lessons-learned during over a quarter of century work in the field of nanomedicine and drug delivery along with a vision statement of some trends and future prospective in this field. Several most recent examples from the UNC and MSU laboratories will be presented including high capacity polymeric micelles for single and multiple water-insoluble drugs and computation guided formulation design for cancer therapy. The nanoscale size polyion complexes formed by ionic block copolymers and polypeptides for the delivery of these polypeptide will be also discussed. Examples include antioxidant enzymes (e.g. superoxide dismutase, catalase), stoichiometric and catalytic scavengers of organophosphorus

toxins (butyrylcholine esterase, organophosphate hydrolase) and neurotrophins (brain-derived neurotrophic factor, glial cell line-derived neurotrophic factor). The applications include treatments of obesity, stroke, Parkinson's disease (PD), RETT syndrome, organophosphorus toxins poisoning, and some other medical conditions that have been demonstrated using animal models. The application of these complexes in the context of the macrophage carriers for drug delivery to the site of inflammation will be presented. A concept of the use of genetically modified macrophages as natural gene delivery vectors will be stated and illustrated using PD therapy as an example. The role of exosomes in gene and protein delivery and its potential as a true pharmaceutical modality will be also discussed.

MODULATION OF THE PROCESS OF AGING IN HUMAN ORGANISM. RECENT ADVANCES ON BIOMARKERS FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT

Aristidis Tsatsakis, Persa Fragkiadaki, Elena Vakonaki, Athanasio Alegakis, Katerina Karataraki and Demetrios Tsoukalas

Laboratory of Toxicology, School of Medicine, University of Crete, Greece

E-mail: satsaka@uoc.gr

Aging is a multifactorial process. Main factors that interplay in the aging process are free radicals and oxidation, insulin and insulin growth factors, sirtuins, mTOR, microbiome, lack of micronutrients and declining proteasome activity. All the above processes have in common that cellular damage is caused and accumulated. This brings to apoptosis and/or autophagy and cell replacement or repair. Stem cells in various organs replicate to replace damaged cells. For each replication the telomeres of the related stem cells become shorter and this is the basic factor that modulates aging. Telomeres are not only a sign of aging but the expression of it. Telomere length shortens with age and leads to senescence. Shorter telomeres are associated with increased incidence of aging related diseases and shorter lifespan. Recently was demonstrated that telomere re-lengthening can reverse aging phenotype. Diverse lifestyle, environmental and nutritional factors influence positively and/or negatively telomere length. Telomere length at birth can vary from 5000-15000 pair bases, so the rate of telomere shortening is a more important biomarker than the absolute telomere length. Average telomere length has been used into epidemiological studies. It's not a good biomarker for a clinical evaluation because it gives no data on the percentage of short telomeres. Measurement of all telomeres through Q-FISH is necessary to evaluate single telomere length and percentage of short telomeres. The percentage and rate of increase of the percentage of short telomeres predicts longevity in mammals. We have formed a data base measuring leucocyte telomere length (LTL) of different age groups within a healthy adult population, through Q-FISH, creating a reference range based on age and percentile distribution of LTL. Repeated measurements at a distance of 6 months or a year can reveal the rate of change of the short telomeres, and response of patients to treatments, lifestyle, diet, supplementation and exercise modifications. A natural product telomerase activator -TA-65, an astragalus extract- has been found to lengthen telomere in humans. We have measured telomerase activation in cell cultures and found that TA-65 activated telomerase in relation to cell control group ranging from 143-222%, in diverse measurements. We've been able to found that diverse natural supplements and combinations of activate telomerase in human cells. Several trade formulations studied and showed effects on telomerase modulation (e.g. Meetab's "My Shape" supplement activated telomerase by 133%, Natural Doctor's "Complete D3&K2 Cofactors" activated telomerase by 189%). By experimenting with different combinations of cyloastragenol (astragalus extract active molecule) we've able to reach telomerase activation of

plus 800% in relation to the control cells. Within our experiments we've been able to discover a natural molecule -08AGTL- that also activates telomerase up to 1300% in relation to the control cells.

КОПЕПОДНЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ КАК БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕПОРТЕРЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

С. В. Маркова

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, 660036, Россия

Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, Россия

E-mail: svetlana@ibp.ru

Секретируемые люциферазы морских копепод представляют собой относительно маленькие белки размером ~18.4-24.2 кДа, катализирующие окисление субстрата целентеразина в простой реакции без кофакторов с излучением голубого света. Наиболее известными представителями копеподных люцифераз являются люциферазы *Gaussia* и *Metridia*. Эти белки, высокоомологичные между собой, не имеют никакого сходства последовательностей с другими известными типами целентеразин-зависимых люцифераз, такими как внутриклеточная люцифераза *Renilla* или секретируемые люциферазы *Oplophorus* и *Cypridina* [1]. Первые клонированные люциферазы из *Gaussia princeps* и *Metridia longa* сразу же были успешно использованы как высокочувствительные биолюминесцентные репортеры в биологических и медицинских исследованиях, включая биоимиджинг *in vivo*, и с тех пор сфера их применения неуклонно расширяется.

При помощи функционального скрининга для люциферазы *Metridia longa* нами был изолирован целый ряд кДНК генов изоформ, четко разделяющийся на 4 неаллельные группы генов по сходству последовательностей. При этом одна из групп имеет больше сходства с люциферазой *Gaussia*, чем с другими изоформами люциферазы *M. longa* [2]. Все изоформы содержат короткий отщепляемый сигнальный пептид из 17 аминокислотных остатков (а/к) для секреции, эффективно работающий в клетках насекомых и млекопитающих. Анализ последовательностей копеподных люцифераз выявляет варибельный N-конец размером около 1/3 у самой длинной изоформы и консервативный С-конец, предположительно образованный двумя неидентичными повторами по ~70а/к. На делеционных мутантах показано, что именно С-конец отвечает за каталитическую активность. В пределах каталитической части находится 10 высоконсервативных остатков цистеина, предполагая наличие до 5 дисульфидных связей, которые, видимо, и определяют высокую термостабильность копеподных люцифераз.

Биолюминесцентные свойства различных изоформ люциферазы *M. longa* и *G. princeps* были изучены на чистых рекомбинантных белках с нативной структурой, полученных с помощью бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых. Репортерные свойства различных изоформ люциферазы *M. longa* и ее мутантных форм были охарактеризованы в клетках млекопитающих и человека [3]. Наибольшие различия найдены в кинетике и температурном оптимуме биолюминесцентной реакции, а также в стабильности вариантов. Предполагается, что наличие различных изоформ и мутантов люцифераз с различными свойствами дает возможность выбрать наиболее подходящий репортер для решения исследовательских задач в зависимости от условий эксперимента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта №16-44-242099.

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., VysotskiE.S. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells // BBRC. – 2017. – V. 483, №1. – P. 772-778.
3. Маркова С.В., Маликова Н.П., Высоцкий Е.С., Франк Л.А., Гительзон И.И. Биолюминесцентный мониторинг обеспечивает возможность регистрации внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток и тканей // Биофизика. – 2017. – Т. 62, №3. – С. 618-624.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ КАК БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕПОРТЕРЫ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МИКРОАНАЛИЗА

Л.А. Франк

Институт биофизики СО РАН, (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), 660036. Красноярск, Россия.

Академгородок, 50, стр. 50

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

E-mail: lfrank@yandex.ru

Гибридные (химерные, фьюжин) белки — это белки, полученные методом генной инженерии путем слияния в одной рамке считывания нескольких ДНК, кодирующих различные белки или олигопептиды. Условно эти белки можно разделить на две группы:

а) Гибриды целевого белка и вспомогательного полипептида, наличие которого обеспечивает либо направленную экспрессию целевого белка (в цитоплазму, периплазму клетки-хозяина или внешнюю среду), что иногда необходимо для обеспечения его функциональной активности, либо возможность выделения целевого белка аффинной хроматографией. Часто вспомогательные полипептиды удаляют на конечной стадии очистки;

б) Многофункциональные гибриды, обладающие свойствами входящих в его состав родительских белков, каждое из которых представляет потребительскую ценность. Главным преимуществом таких гибридных белков является возможность получения многофункциональных белков, минуя химическое конъюгирование, неизбежно приводящее к частичной потере активности исходных белков.

Результаты. В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН проводятся многолетние исследования, направленные на создание высокочувствительных аналитических систем для биомедицины на основе светоизлучающих белков – люцифераз и фотопротеинов, в качестве репортеров. При этом решаются задачи получения репортерных белков в чистом виде, а также биоспецифических биолюминесцентных меток для молекулярного анализа. Использование технологии гибридных белков позволяет решать обе эти задачи. В таблице представлены некоторые гибридные биолюминесцентные белки, назначение входящих в их состав доменов, а также потенциал и результаты применения в микроанализе.

Таблица – Примеры биолюминесцентных гибридных белков, их состав и назначение

Состав гибридного белка, название	Назначение гибрида, и его составных частей	Клетка-хозяин; адрес накопления гибрида	Ссылка
Анти-ВКЭ-антитело-люцифераза <i>Renilla</i> - полиHis 14D5a-Rm7	Метка для иммуноанализа ВКЭ; Histag- поли His фрагмент для металл-аффинной очистки гибрида	<i>E.coli</i> Rosetta gami2; цитоплазма	[1]
pelB-Анти-ФНО-антитело-люцифераза <i>Renilla</i> - полиHis G1-Rm7	Метка для иммуноанализа ФНО pelB — лидерный пептид для переноса гибрида в периплазматическое пространство;	<i>E.coli</i> HB2151; периплазма	[2]
Стрептавидин-Обелин Stavi-Obe	Метка для анализа биотинилированных молекул	<i>E.coli</i> BL21 CodonPlus (DE3); тельца включений	[3]
Белок <i>S. aureus</i> -Обелин proZZ-Obe	Метка для выявления IgG БелокА золотистого стафилококка связывает Fc фрагменты иммуноглобулинов класса G	<i>E.coli</i> BL21-CodonPlus (DE3); тельца включений	[4]
ПолиHis-MBP-(TEV)-Люцифераза <i>Renilla muelleri</i> 7 RmLuc7	Получение рекомбинантной люциферазы <i>Renilla muelleri</i> 7; MBP–малат-связывающий белок, вспомогательный белок для обеспечения экспрессии гибрида в цитоплазму. TEV- сайт гидролиза протеазой вируса табачной мозаики, для удаления вспомогательного фрагмента ПолиHis-MBP.	<i>E.coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL; цитоплазма	[5]

Бактериальная экспрессия целевых белков, обеспечивая дешевое и быстрое получение целевых белков с одной стороны, имеет ряд ограничений, когда речь идет о получении белках эукариот, с другой стороны. Отсутствие механизмов пост-трансляционной модификации, характерной для эукариотических клеток может привести к получению белков с неправильной пространственной структурой и, как следствие, заниженной или отсутствующей биоспецифической активностью. В современной биотехнологии разработан ряд подходов, позволяющих избежать эти проблемы: разнообразные бактериальные штаммы-хозяева, плазмидные вектора, ферменты и носители. Как видно из материала, представленного в таблице это разнообразие позволяет успешно решать проблемы экспрессии гибридных белков – биоспецифических биолюминесцентных меток для молекулярного анализа. Гибридный белок 14D5a-LRm7, созданный для выявления вируса клещевого энцефалита позволяет выявлять мишень с чувствительностью, равной таковой сертифицированного метода РТ-ПЦР (10^4 - 10^5 вирусных частиц), но при этом гораздо быстрее и проще [1]. Белок G1-Rm7, полученный для высокочувствительного выявления цитокина фактора некроза опухолей, выявляет до 1,6 нг/мл ($9,4 \cdot 10^{-11}$ М) ФНО [2]. Гибрид Stavi-Obe, является универсальной меткой для систем на основе высокоаффинного биотин-стрептавидинового взаимодействия. Показано, что он обладает существенно более высокой чувствительностью чем химический конъюгат родительских белков стрептавидина и обелина [3].

К сожалению, на сегодняшний день не существует универсальной технологии, обеспечивающей успешный синтез любого рекомбинантного белка. Каждый из описанных нами гибридов получен с помощью оригинальной системы экспрессии, при создании которой рациональный вариант, позволяющий сохранить биоспецифическую активность входящих в гибрид доменов, обеспечить его быструю очистку и высокий выход был выбран эмпирически.

Литература

1. L.P. Burakova A.N. Kudryavtsev, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407: 5417-5423
2. Патент РФ № 2513686. Опубликовано 20.04.2014. Бюл. № 11
3. E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, V.G. Grigorenko, L.A. Frank. Hybrid minimal core streptavidin-obelin as a versatile reporter for bioluminescence-based bioassay. *Photochem. Photobiol.* 2017, 93: 548-552
4. L.A. Frank, V.A. Illarionova, E.S. Vysotski. Use of proZZ-obelin fusion protein in bioluminescent immunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 219: 475-479
5. G.A. Stepanyuk, J. Unch, N.P. Malikova, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski. Coelenterazine-v ligated to Ca^{2+} -triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of Renilla muelleri luciferase. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. 398: 1809-1817

CAN LIVING ORGANISMS IN BIOASSAYS BE REPLACED ON ENZYMES?

Valentina Kratasyuk^{1,2}, Elena Esimbekova^{2,1}

¹*Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Svobodnyi av. 79, Krasnoyarsk 660041, Russia, valkrat@mail.ru*

²*Institute of Biophysics SB RAS, Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk 660036, Russia, E-mail: esimbekova@yandex.ru*

Fundamental scientific problem that could 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 solution of this problem is important not only for all economic activities, but also it has significant importance in agricultural production and productivity in crop production. The searching of integral characteristics, which allow to assess the consequences of human impact on water, soil and air are very important. It should be noted the lack of developed methodology for integrated monitoring in the world practice that would help to solve the problem of integrated monitoring of the ecosystems. 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. The proposed new approach and methodology of biochemical design of a set of enzymatic bioassays, in this project, are the basis for the all-round bioassay called «enzymatic functional model of the living organism»; the development of scientific bases of such biochemical design could help to solve mentioned problems. The development of principles and mechanisms of a new methodology for biochemical design and a new fast methods for the bioluminescent analysis, which are intended for inclusion in a comprehensive system of assessment of the toxicity of different ecological environments is described. The bioluminescent

methods of analysis are applied to the integrated task of assessing the ecotoxicity. 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 have been shown. Methodological approaches will be different, because it will be developed as rapid non-specific methods and as a selective analysis is based on the measurement of markers, the markers will be the substrates of bioluminescent reactions and the activity of enzymes involved in luciferase enzymatic chains.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 16-14-10115).

МОДИФИКАЦИЯ N- И C-КОНЦЕВЫХ УЧАСТКОВ ФОТОПРОТЕИНА БЕРОВИНА ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Л.П. Буракова¹, Т.С. Красильникова², Е.С. Высоцкий¹

¹ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036 Россия, Красноярск Академгородок, 50/50

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», 660041 Россия, Красноярск, пр. Свободный, 79

E-mail: burakoval@mail.ru

За биолюминесценцию ктенофор отвечают целентеразин-зависимые Ca^{2+} -регулируемыми фотопротеины, которые по своей функции схожи с фотопротеинами гидромедуз, зарекомендовавших себя в качестве индикаторов внутриклеточного кальция и репортерных молекул в иммуноанализе, в том числе и в составе слитых белков [1]. При этом степень идентичности аминокислотных последовательностей фотопротеинов ктенофор и гидромедуз составляет не более ~25% [2]. Поскольку беровин, отвечающий за биолюминесценцию *Beroe abyssicola*, представляет собой новый тип фотопротеинов, имеет более высокую чувствительность к кальцию, чем фотопротеины гидромедуз, и не требует присутствия восстанавливающих агентов для активации, в отличие от обелина и акворина, то представляется перспективным его использование в аналитических целях. Для того чтобы получить конъюгаты или слитые белки, обладающие как биоспецифическими характеристиками, так и способностью излучать свет, необходимо подвергнуть модификации N- или C-концевые области входящих в их состав белков, что может сказаться на их свойствах.

Все фотопротеины гидромедуз, за исключением митрокомина, содержат на C-конце остаток пролина, который играет важную роль в стабилизации фотопротеинового комплекса, образуя водородную связь с остатком аргинина, находящимся в первой α -спирали. Удаление этого остатка пролина в рекомбинантных авкорине и обелине ведет к снижению выхода активного белка, стабильности и биолюминесцентной активности [3]. У митрокомина после остатка пролина находится тирозин, роль которого, однако, не совсем понятна, поскольку укороченный мутантный белок без тирозина имеет более высокую удельную активность, чем дикий вариант [4]. C-концевой беровина богат остатками тирозина, один из которых, Tyr208, является терминальным, а Tyr204 предположительно локализован в субстрат-связывающей полости, предположительно, участвует в стабилизации пероксицелентеразина [5].

Результаты. В данной работе с помощью сайт-направленного мутагенеза исследована функциональная роль C-концевого остатка Tyr и первой N-концевой α -спирали

в биолюминесценции беровина, а также влияние удлинения С-концевого участка за счет присоединения полигистидиновой последовательности на биолюминесценцию фотопротейна. С помощью лигирования ПЦР-фрагмента, содержащего кодирующую последовательность гена беровина с вектором рSAV, содержащим ген стрептавидина, получена экспрессионная конструкция, позволяющая получать в клетках *E. coli* слитый белок, обладающий сродством к биотину и биолюминесцентными свойствами. На примере твердофазного биоспецифического анализа показана возможность его использования в детекции биотинилированных производных.

В результате проведенного исследования выяснено, что замена Tyr208 на Phe в беровине практически не влияет на его биолюминесценцию, тогда как делеция этого аминокислотного остатка или замена его на Ala ведет к резкому снижению выхода активного белка и почти полной потере биолюминесцентной активности. Это позволяет предположить его участие в стабилизации фотопротейна за счет взаимодействия с N-концевой α -спиралью, делеция которой также существенно снижает способность к формированию активного фотопротейнового комплекса и биолюминесцентную активность беровина. Удлинение С-концевого участка беровина за счет 6 остатков His приводит к такому же снижению биолюминесцентной активности, как и делеция Tyr208, но не так критично влияет на активацию апобелка, снижая выход активного фотопротейна только в 2 раза.

Заключение. Показано, что Tyr208 в беровине участвует в стабилизации фотопротейнового комплекса, причем, предположительно, ни его боковая гидроксильная группа, ни С-концевая карбоксильная группа не играют ключевой роли во взаимодействии с N-концевым участком молекулы. При этом координация фотопротейнового комплекса происходит, скорее всего, с участием первой α -спирали, поскольку ее удаление значительно снижает выход активного белка и биолюминесцентную активность. Удлинение С-концевого участка нежелательно, поскольку биолюминесцентная активность такого белка почти на 3 порядка ниже, чем у беровина дикого типа. Активность слитого белка, где присоединение биоспецифической части молекулы происходит к N-концевой части беровина, составляет только 1% от таковой беровина дикого типа, однако этого достаточно для обнаружения биотинилированных молекул в концентрации 1,4 нг/мл. При этом слитый белок демонстрирует большую термостабильность, чем беровин дикого типа, что делает его перспективным для применения в биоспецифическом анализе.

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

Литература

1. Bashmakova E.E. Minimal Core Streptavidin-Obelin as a Versatile Reporter for Bioluminescence-based Bioassay / E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, V.G. Grigorenko, L.A. Frank // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93. – P. 548-552.
2. Markova S.V. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of Ca^{2+} -regulated photoprotein / S.V. Markova, L.P. Burakova, S. Golz, N.P. Malikova, L.A. Frank, E.S. Vysotski // FEBS J. – 2012. – 279. – P. 856-870.
3. Eremeeva E.V. Hydrogen-bond networks between the C-terminus and Arg from the first α -helix stabilize photoprotein molecules / Eremeeva E.V., Burakova L.P., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Shimomura O., Frank L.A. // Photochem. Photobiol. Sci. – 2014. – 13. – P. 541-547.
4. Burakova L.P. Mitrocomin from the jellyfish *Mitrocoma cellularia* with deleted C-terminal tyrosine reveals a higher bioluminescence activity compared to wild type photoprotein /

Burakova L.P., Natashin P.V., Markova S.V., Ereemeeva E.V., Malikova N.P., Cheng C., Liu Z.J., Vysotski E.S. // J Photochem. Photobiol. B. – 2016. – 162. – P. 286-297.

5. 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.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ У ЛЮЦИФЕРАЗЫ *METRIDIALONGA*

Т.В. Бадиева², С. В. Маркова^{1,2}

¹Институт биофизики СО РАН, ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, 660036, Россия

²Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, Россия

E-mail: badieva1994@mail.ru

Люцифераза морских копепод *Metridia longa* (MLuc) катализирует простую реакцию окисления субстрата целентаразина без каких-либо кофакторов с испусканием голубого света с $\lambda \sim 480$ нм [1]. Благодаря своей высокой активности и термостабильности, простоте реакции и широкому линейному диапазону детекции белка люциферазы *M.longa* является перспективным репортером для биологических и медицинских исследований, отлично зарекомендовавшим себя при использовании *in vitro* [2] и *in vivo* [3]. Однако, пространственная структура люциферазы *M.longa* до сих пор не известна, также остаются неясными и структурно-функциональные взаимосвязи. Анализ последовательности клонированных изоформ для люциферазы *M.longa* позволяет идентифицировать два неидентичных повторяющихся тандемных домена в структуре белка. Потенциально каждый такой домен может обладать каталитической функцией. Одним из требований, предъявляемых к репортерному белку, является минимизация его размера для предотвращения неспецифических взаимодействий, а также для снижения неспецифической метаболической нагрузки на клетку, если репортер используется в качестве генетически-кодируемого внутри клетки или организма.

Задачей данной работы было получение и исследование активности делеционных мутантов люциферазы *M.longa* для выяснения структуры и свойств каталитической последовательности, которая может быть далее использована в качестве репортерной.

Серия делеционных мутантов для самой короткой изоформы MLuc7 люциферазы *Metridialonga* была получена методами генетической инженерии путем ПЦР-синтеза с последующим клонированием в экспрессионный вектор pET22b+ для прямой экспрессии в *E. coli*. Структура полученных делеционных вариантов подтверждена секвенированием. Активность укороченных мутантных вариантов MLuc7 оценивали по биолюминесцентной активности грубых клеточных лизатов. Уровень синтеза белка в лизатах оценивали визуально по результатам гель-электрофореза с маркерными белками.

Последовательность MLuc7, самой маленькой люциферазы из известных, приблизительно соответствует консервативному С-концевому домену ~ 16.5 кДа, выявляемому при сравнении структур копеподных люцифераз. В данной работе показано, что последовательное удаление до 14 аминокислотных остатков с N-конца MLuc7 и четырех аминокислотных остатков с С-конца сохраняет биолюминесцентную активность люциферазы, но приводит к падению активности MLuc7 при комнатной температуре от 4 до 14 раз в зависимости от структуры исследованных усеченных белков. Таким образом, в

настоящей работе минимальная последовательность с каталитической активностью у люциферазы *Metridialonga* локализована до 134 аминокислотных остатка или ~14.5 кДа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта №16-44-242099.

Литература

1. Маркова С.В., Высоцкий. Е.С. Целентеразин-зависимые люциферазы // Биохимия. – 2015. – Т. 80, №6. – С.845–866.
2. Borisova V.V., Frank L. A., Markova S.V., Burakova L.P., Vysotski E.S. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V.7. – P.1025-1031.
3. Маркова С.В., Маликова Н.П., Высоцкий Е.С., Франк Л.А. Гительзон И.И. Биолюминесцентный мониторинг обеспечивает возможность регистрации внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток и тканей // Биофизика – 2017. – Т. 62, №3. – С. 618–624.

АНАЛИЗ ИНГИБИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ РЯДА ФЕРМЕНТОВ

Я.В. Фрицлер¹, Е.Н. Есимбекова^{1,2}

¹*Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, г. Красноярск, проспект
Свободный 79*

²*Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский
научный центр СО РАН», Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50
E-mail: fri.yana@mail.ru*

В связи с увеличением масштаба производства и использования в производственной и хозяйственной деятельности человека огромного количества новых материалов остро стоят проблемы, связанные с оценкой безопасности их применения для человека и биосферы в целом. К таким новым материалам относятся, например, наноматериалы, активно применяющиеся в медицине, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности [1]. Так как скорость появления новых материалов обгоняет скорость разработки методов для оценки их токсичности, то можно констатировать отсутствие адекватных методов для экспрессной оценки материалов. Для решения этой проблемы прослеживается тенденция к адаптации уже существующих, разработанных для других задач, методов. Для решения этой проблемы предлагается провести конструирование набора ферментативных тестов, позволяющих оценивать эффект воздействия новых материалов на ключевые ферменты метаболических цепей и, таким образом, выявлять механизм оказываемого негативного эффекта на живой организм в целом.

Цель работы – проведение анализа ингибирующего воздействия наночастиц на основе металлов на активность ряда ключевых ферментов метаболических путей живых организмов.

Материалы и методы. Для работы выбраны ферменты, отражающие значимые изменения в метаболизме человека и других организмов: бутирилхолинэстераза (BuChE), алкогольдегидрогеназа (ADH), трипсин, NADH:FMN-оксидоредуктаза (R), люцифераза (L). Был проведен анализ степени воздействия наночастиц на основе металлов на функционирование моно-, би- и триферментных реакций. В качестве наноматериалов были

выбраны коммерчески доступные и наиболее распространенные наночастицы серебра (Ag), диоксида титана (TiO₂) и диоксида кремния (SiO₂).

Степень воздействия наночастиц на активность ферментов оценивали по величинам IC₂₀ и IC₅₀, которые равны концентрациям наночастиц, вызывающим изменение параметра ферментативной реакции на 20 и 50% соответственно. Во избежание искажения биолюминесцентного сигнала эффектом фильтра были изучены абсорбционные характеристики наночастиц и проведена необходимая корректировка результатов [2].

Результаты. При проведении ингибиторного анализа наночастиц были получены зависимости типа «доза-эффект». По концентрационным зависимостям были рассчитаны значения параметров ингибирования IC₂₀ и IC₅₀ (табл. 1).

Таблица 1 – Значения параметров IC₅₀ и IC₂₀ (мг/л), определенные при оценке влияния образцов наночастиц разных размеров (нм) на моноферментные реакции

Наночастицы		SiO ₂			TiO ₂		Ag
		10-15	100-120	120-150	50-70	100-190	20
BuChE	IC ₂₀	28,3±2,0	20,1±1,2	15±1,4	16,2±1,1	10,8±0,7	1,9±0,1
	IC ₅₀	56,8±3,9	48,3±2,9	44±4,0	30,5±2,1	24±1,4	5,2±0,4
Трипсин	IC ₂₀	25,0±2,1	15,8±0,1	12,6±0,2	4,9±0,3	2,4±0,2	0,7±0,1
	IC ₅₀	55,7±4,5	45,9±2,8	35,8±2,5	18,6±1,3	11,1±0,9	1,8±0,2
ADH	IC ₂₀	7,6±0,7	7,1±0,5	5,8±0,4	1,7±0,2	1,4±0,1	0,3±0,03
	IC ₅₀	15,5±1,4	14,5±1,0	8,5±0,5	3,4±0,4	3,3±0,2	0,9±0,1
R	IC ₂₀	6,8±0,5	4,5±0,4	3,7±0,2	2,1±0,2	1,2±0,1	0,1±0,01
	IC ₅₀	14,9±1,0	12,1±1,0	10,6±0,6	4,7±0,4	2,4±0,2	0,6±0,06

В табл. 2 представлены значения параметров IC₂₀ и IC₅₀, полученные при анализе степени воздействия наночастиц на биферментную R+L и триферментную R+L+ADH реакции.

Таблица 2 – Значения параметров IC₅₀ и IC₂₀ (мг/л), определенные при оценке влияния образцов наночастиц на биферментную (R + L) и триферментную систему (R + L + ADH)

Наночастицы		R+L		R+L+ADH	
		IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₂₀	IC ₅₀
SiO ₂	10-15 нм	26,2±2,4	42,1±3,8	21,0±2,1	-
	100-120 нм	23,9±2,4	35,8±3,6	12,0±1,1	49,1±4,4
	120-150 нм	15,1±1,2	31,0±2,5	11,2±0,8	31,7±2,2
TiO ₂	50-70 нм	13,3±1,2	22,9±2,5	10,2±0,8	34,3±2,7
	100-190 нм	6,7±0,7	15,3±1,5	5,2±0,5	17,0±1,7
Ag	20 нм	1,3±0,2	2,2±0,3	1,7±0,1	2,5±0,2

«-» – в исследуемом диапазоне концентраций значение параметра не определено

При анализе воздействия наночастиц на активность ферментов было выявлено, что наиболее подвержены действию наночастиц ADH и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза. Получено, что изменение активности ферментов зависит от размеров наночастиц. Наибольшее ингибирующее воздействие на активность ферментов оказывают наночастицы серебра.

Показано, что изученные наночастицы ингибируют активность как биферментной системы R+L, так и триферментной R+L+ADH. Наибольший ингибирующий эффект на биферментную R+L и триферментную R+L+ADH системы оказывают вновь наночастицы серебра. Параметры IC₅₀ и IC₂₀, полученные для биферментной R+L и триферментной

R+L+ADH систем имеют сходные значения. Таким образом, удлинение цепи сопряжения реакций, катализируемых оксидоредуктазами, не приводит к увеличению ингибирующего воздействия наночастиц на ферментативные системы.

Заключение. Полученные в работе значения IC_{50} и IC_{20} позволили ранжировать анализируемые наночастицы по степени ингибирующего воздействия на активность ферментов. В исследуемых диапазонах концентраций наночастиц ингибирующее воздействие уменьшается в ряду $Ag > TiO_2 > SiO_2$, что согласуется с результатами других биологических методов. Представленные в работе ферментативные тест-системы имеют высокий потенциал для развития методов анализа токсичности различных классов наноматериалов.

Литература

1. Etheridge, M. L., Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine / M. L. Etheridge, S. A. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes et al. // Journal Nanomedicine: Nanotechnol, Biol. Med. – 2013. – № 9. – pp. 1–14.
2. Алешина, Е.С.. Коррекция результатов биолюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых углеродных наноматериалов / Е.С. Алешина, И.П. Болодурина, Д.Г. Дерябин, М.Г. Кучеренко // Журнал Вестник ОГУ. – 2010. – № 6. – с. 141–146.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНЫХ ФОРМ ФОТОПРОТЕИНОВ С ЗАМЕНАМИ ВСЕХ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА НА СЕРИН

Е.В Еремеева, Е.С. Высоцкий

Институт биофизики СО РАН, (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), 660036. Красноярск, Россия.

Академгородок, 50, стр. 50

E-mail: l_ermeeva@mail.ru

Биолюминесценция – явление, широко представленное в природе и присущее многим организмам в различных филогенетических ветвях: от бактерий до рыб. Одними из наиболее изученных биолюминесцентных белков являются Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение ряда морских кишечнорастворимых организмов. Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина (~22 kDa) и молекулы органического субстрата – 2-гидропероксицелентеразина [1]. Связывание ионов кальция инициирует конформационные изменения в белке, запускающие реакцию окислительного декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, в результате которой образуется целентерамид в возбужденном состоянии и CO_2 [2]. Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света.

Активный фотопротеин образуется при инкубации апофотопротеина с субстратом целентеразином в отсутствие ионов кальция и в присутствии молекулярного кислорода и восстанавливающего агента [3]. Считается, что для эффективного формирования активного фотопротеинового комплекса необходимо восстановить внутримолекулярные дисульфидные связи рекомбинантного фотопротеина, которые могут затруднять связывание субстрата [4]. Кроме того, межмолекулярные дисульфидные связи могут быть причиной олигомеризации апофотопротеинов, что дополнительно усложняет процесс активации [4].

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины гидромедуз, изученные к настоящему времени, содержат три (акворин и клитин) или пять (обелин и митрокомин) остатков цистеина, причем один из них является высоко консервативным. Возможность избавиться от необходимости использования восстанавливающих агентов при активации фотопротеинов представляется перспективной задачей, поскольку для ряда аналитических приложений необходимо участие гибридных белков, в которых партнером фотопротеина является целевой белок, чувствительный к восстанавливающему агенту.

Цель. Получение мутантных фотопротеинов акворина и обелина с заменами всех остатков цистеина на серин и исследование физико-химических и биоллюминесцентных свойств в сравнении с соответствующими фотопротеинами дикого типа.

Результаты. Мутантные формы обелина и акворина с заменами всех остатков цистеина на серин были получены серией последовательных реакций нуклеотид-направленного мутагенеза. Затем мутантные апофотопротеины вместе с соответствующими апофотопротеинами дикого типа были экспрессированы в клетках *E. coli*, выделены из телец включения и очищены с помощью ионообменной хроматографии. Все полученные белки были охарактеризованы по ряду параметров: рассчитаны константы диссоциации комплекса апофотопротеина с субстратом, константа скорости образования активного фотопротеинового комплекса, степень олигомеризации апофотопротеина и выход активного белка, удельная биоллюминесцентная активность, спектральные и кинетические характеристики биоллюминесцентной реакции, а также конформационная стабильность полученных белков.

Замена всех остатков цистеина на серин по-разному отразилась на свойствах акворина и обелина. Мутант акворина сохранил ряд характеристик акворина дикого типа, например кинетические параметры активации и биоллюминесцентной реакции, однако его удельная биоллюминесцентная активность снизилась в два раза. Мутант обелина сохранил только 10% удельной биоллюминесцентной активности обелина дикого типа, а также продемонстрировал гораздо худшие параметры связывания апобелка с субстратом и кинетику активации. Кроме того, замена всех остатков цистеина в обелина значительно замедлила кинетику биоллюминесцентной реакции белка, полностью удалив быструю компоненту. Произведенные мутации существенно увеличили конформационную лабильность обоих белков, снизив значения точек перехода для реакции температурного анфолдинга.

Заключение. Таким образом, из двух охарактеризованных белков только акворин с заменами всех остатков цистеина на серин может быть использован для создания гибридных белков в случае, если целевой белок чувствителен к использованию восстанавливающих агентов, поскольку данный мутант сохраняет около 50% биоллюминесцентной активности акворина дикого типа и может быть эффективно получен в достаточном количестве.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №17-04-00764 и тем государственного задания №0356-2016-0712 и №0356-2015-0103.

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. Vysotski, E.S. Ca^{2+} -regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism / E.S. Vysotski, J. Lee // Acc. Chem. Res. – 2004. – V. 37. – P. 405–415.
3. Shimomura, O. Regeneration of the photoprotein aequorin / O. Shimomura, F.H. Johnson // Nature. – 1975. – V. 256. – P. 236–238.
4. Ohmiya, Y. Mass spectrometric evidence for a disulfide bond in aequorin regeneration / Y. Ohmiya, S. Kurono, M. Ohashi, T.F. Fagan, F.I. Tsuji // FEBS Lett. – 1993. – V. 332. – P. 225–228.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА КАЧЕСТВА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

В.П. Калябина¹, Е.Н. Есимбекова^{1,2}, И.Г. Торгашина¹

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

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

E-mail: valeriyakalyabina@mail.ru

Нарастающее техногенное воздействие со стороны городов, промышленности и транспорта приводит к накоплению загрязнителей и токсикантов в почве и продуктах питания, выращенных на садово-огородных участках [1,2]. Исследование безопасности сельскохозяйственных продуктов питания является важным аспектом для России, поскольку для большей части населения страны овощная продукция является значительной частью пищевого рациона. Существенная часть растительной продукции, реализуемой на территории нашей страны, загрязнена тяжелыми металлами и пестицидами, ряд из которых запрещен в России [3]. Компонентный химический анализ веществ не позволяет в полной мере говорить о качестве продуктов питания. Для обеспечения безопасности использования в пищу овощных культур, необходимо иметь надежные методы анализа, в связи с чем, создание методик комплексной оценки качества пищевой продукции является актуальной задачей [2].

Цель работы – разработка экспресс-метода оценки качества сельскохозяйственных продуктов питания с помощью биолюминесцентных ферментативных систем.

Материалы и методы. В основе предлагаемого метода лежит обнаружение токсических свойств анализируемых веществ по их влиянию на функционирование ферментов светящихся бактерий. Методы биолюминесцентного анализа на основе ферментативных реакций отличаются высокой чувствительностью к действию разных классов потенциально вредных соединений и могут быть использованы для оценки безопасности пищевой продукции. В качестве объекта исследования использовали образцы овощных культур.

Результаты. Проведены модельные эксперименты оценки ингибирующего воздействия токсикантов на параметры биолюминесценции биферментной системы светящихся бактерий: NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза (Р + Л). Степень воздействия токсикантов на активность системы Р + Л оценивали по величине параметров IC₂₀ и IC₅₀, представляющих собой концентрации токсикантов, вызывающие снижение активности системы на 20 и 50% соответственно.

Показано, что ферментативная система светящихся бактерий является чувствительной к ряду металлов, в том числе свинцу, цинку, меди, ртути, алюминию и хрому на уровне и ниже уровня их ПДК. Наибольшее ингибирующее воздействие на активность биферментной системы оказывает медь. Кроме того, было показано, что предел чувствительности ферментативной системы к действию таких пестицидов как α- и γ- изомеры гексахлорциклогексана, 4,4-дихлордифенилэтилен и 4,4-дихлордифенилтрихлорметилметан, соответствует или ниже их максимально допустимого уровня.

Разработана лабораторная методика пробоподготовки образцов овощных культур, совместимая с ферментативной системой светящихся бактерий, и предложена схема проведения биолюминесцентного анализа. Показано, что оптимальные параметры пробоподготовки образца составляют 5 минут центрифугирования при скорости 10000 g и температуре 25 °С. Выявлена степень влияния экстрактов сельскохозяйственных продуктов питания на активность биолюминесцентных ферментативных систем светящихся бактерий. Исследование зависимости от времени и условий хранения показало, что экстракты

образцов, подготовленные для анализа, можно хранить при комнатной температуре около часа и в течение суток при 4 °С без значительной потери активности. Был проведен анализ воздействия на ферментативную биолюминесцентную систему различных образцов овощных культур, искусственно загрязненных модельными токсическими веществами для определения чувствительности ферментативной системы к токсикантам в образце.

Заключение. Предложенный биолюминесцентный метод является перспективным для оценки и контроля безопасности сельскохозяйственных продуктов питания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (проект № 16-44-242126).

Литература

1. Nagajyoti, P. C. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review 2010 [Электронный ресурс] / P. C. Nagajyoti, K. D. Lee, T. V. M. Sreekanth // Environmental Chemistry Letters. – 2010. – № 8. – С. 199–216.
2. Amelin, V. G. Determination of polar pesticides in water, vegetables, and fruits by high performance liquid chromatography [Электронный ресурс] / V. G. Amelin, D. K. Lavrukhin, A. V. Tretjakov, A. A. Efremova // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2012. – Т. 67. – № 6. – С. 275–282.
3. Российский институт потребительских испытаний [Электронный ресурс] : Сетевое издание, свидетельство о регистрации Эл № ФС77-54723 от 17 июля 2013. // СМИ. – Режим доступа: <http://www.ripi-test.ru>.

SIRTUIN – THE POTENTIAL NUTRITIONAL BIOMARKER

Shubhra Pande

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

E-mail: drshubhrapane@gmail.com

There is a poor relationship between nutrient intake and existing nutritional biomarkers due to variety of factors affecting their sensitivity and specificity. To explore the impact of nutrients at molecular level and devising a sensitive biomarker, proteomics is a central technology with sirtuins as one of the most promising nutritional biomarker. Sirtuins (seven mammalian sirtuins reported so far), have been reported to perform protein deacetylases and ADP-ribosyltransferases activity. It is distributed in different cellular compartments thereby controlling several metabolic processes. Sirtuins are NAD⁺ dependent which implicates a direct effect of the metabolic state of the cell on its activity. Calorie restriction upregulates the mammalian sirtuin protein levels in variety of tissues and organs where it acts upon both histone and nonhistone substrates. Sirtuin senses nutrient availability and impacts gluconeogenesis, glycolysis and insulin sensitivity. It deacetylates and inhibits the nuclear receptor that activates fat synthesis and adipogenesis in the body, leading to fat loss and bringing favorable cellular and health changes. Sirtuins mediates intracellular response that promotes cell survival, DNA damage repair thereby increasing the cell longevity. The activation of sirtuins brings a wide spectrum of other health benefits and its activity levels are indicative of nutritional status as well as disease progression in cancer, inflammation, obesity, cardiovascular diseases, and viral infections. There are several foods that activate sirtuin activity and offer significant health benefits by their consumption.

СООТНОШЕНИЕ «ПОЛЬЗА-РИСК» КОНСЕРВИРОВАННОЙ САЙРЫ (*COLOLABIS SAIRA*), СОДЕРЖАЩЕЙ НЕЗАМЕНИМЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ И ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

**М.И. Гладышев^{1,2}, О.В. Анищенко², Н.Н. Сушик^{1,2}, О.Р. Махутова^{1,2}, Г.С. Калачёва²,
И.В. Грибовская², В.Н. Моргун³**

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

²*Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский ³центр “Красноярский
Научный Центр СО РАН”, Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия*

³*Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в
Красноярском крае, ул. Вавилова, 1а, Красноярск, 660093, Россия*

E-mail: glad@ibp.ru

Изучено содержание тяжелых металлов и полиненасыщенных жирных кислот в консервированной сайре (*Cololabis saira*), продукте, широко распространенном на территории Российской Федерации. Консервированная сайра считается ценным источником ПНЖК – эйкозапентаеновой кислоты (20:5n-3, ЭПК) и докозагексаеновой кислоты (22:6n-3, ДГК). Для получения рекомендованной для профилактики сердечно-сосудистых и нервных расстройств индивидуальной дозы ЭПК+ДГК, составляющей 1 г в сутки, необходимо употребить в пищу 26-76 г консервированной сайры исследованных распространенных брендов. Анализ тяжелых металлов показал, что содержание свинца в одной торговой марке и содержание кадмия в большей части исследованных проб превышает стандарты Европейской комиссии на промысловую рыбу. Однако оценка соотношения «польза-риск» от потребления рыбы, выраженного как коэффициент опасности, показала, что консервированная сайра является безопасным и ценным продуктом для питания человека.

STABILIZATION STUDIES OF CITRATE-CAPPED GOLD NANOPARTICLES FOR METAL-ENHANCED BIOLUMINESCENCE

Rajeev Ranjan

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

E-mail: rajeev694@gmail.com

Prerequisites for observing metal-enhanced bioluminescence (MEB) at the nanosurface are multiple, among which stability of nanomaterial during bio-functionalization is an important criterion. In this regard, studies were conducted to observe aggregation of gold nanoparticles (AuNPs) under varying ionic strength of sodium chloride (10-200 mM). Introduction of an ionic chelator and a lipid mixture to the synthesized AuNPs were studied for their stability under sonication. The engineered AuNPs is presumed to surround a hydrophobic layer preventing their aggregation even at 200 mM NaCl. These stabilized AuNPs are expected to extend ample surface for bio- functionalization for MEB.

О ПРИМЕНЕНИИ МЕХАНИЗМЕННЫХ МАТЕМАТИЧЕСКИХ И НЕЙРОСЕТЕВЫХ МОДЕЛЕЙ В УПРАВЛЕНИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ НА ПРИМЕРЕ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

С.И. Барцев¹, А.В. Белый²

¹*Институт биофизики СО РАН, (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), 660036, Россия, Красноярск,
Академгородок, 50, стр. 50*

²*АО «Полюс Красноярск», 660061, Россия, Красноярск, ул. Цимлянская, д. 37*

E-mail: bartsev@yandex.ru

Традиционная биотехнология – это наука о методах и технологиях производства различных ценных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов (микроорганизмов, растительных и животных клеток), частей клеток (клеточных мембран, рибосом, митохондрий, хлоропластов) и процессов. Поскольку эти биологические объекты очень сложны, их поведение зависит от многих факторов, а отклик, как правило, не линеен, то и управление биотехнологическими процессами представляет собой непростую задачу. Управление невозможно без качественного прогноза реакции управляемой системы на внешние (управляющие и возмущающие) воздействия.

Прогноз поведения системы можно осуществлять с использованием двух подходов: а) через построение «механизменной» математической модели, потенциально способной предсказывать отклик данной биотехнологической системы на воздействия, которые еще не встречались за время ее эксплуатации; б) с помощью регрессионной модели, которая воспроизводит закономерности биотехнологического процесса, выделенные с помощью статистического анализа из данных, содержащихся в технологических журналах.

Проблемы, связанные с управлением биотехнологическими процессами рассмотрим на примере биологического выщелачивания. Достоинствами биологического выщелачивания являются экологичность, экономичность, расширение сырьевой базы цветных металлов за счёт вовлечения в производство значительных объёмов ранее неперерабатываемого сырья.

Количество факторов, влияющих на процессы химического выщелачивания и на развитие микробного сообщества достаточно велико, причем зависимости скоростей исследуемых процессов от этих факторов, как правило, имеет нелинейный характер. Попытки изначального построения «механизменной» математической модели промышленного биотехнологического процесса показали, что такое начало работы со сложной системой в целом нереально и методически неправильно. Сначала нужно убедиться в том, что набор измеряемых и управляющих параметров процесса достаточен для осуществления прогноза поведения системы, что описание системы замкнуто, по отношению к ее динамике. Если есть закономерности между входами и выходами, то можно говорить о причинно-следственной связи и возможности моделирования (полнота параметров состояния системы). Отсюда следует, что регрессионные и механизменные модели не являются взаимоисключающими альтернативами, методологически дополняют друг друга.

В то же время простыми попарными сравнениями и двумерными регрессионными уравнениями выявить закономерности поведения биотехнологической системы невозможно. Необходимо обращаться к многомерным регрессионным моделям. При этом линейные регрессионные многомерные модели не подходят, поскольку, в типичном случае, биологические системы существенно нелинейны. Значит, для первичного выделения закономерностей необходим математический аппарат, позволяющий проводить многомерный нелинейный регрессионный анализ. Активно развиваемое направление

обработки информации под названием «нейронные сети» как раз и предоставляет такой аппарат.

С помощью нейросетевого анализа показано, что для технологических процессов прогноз процесса возможен со средней относительной точностью в интервале от 10% до 2% для различных показателей (рис. 1, 2).

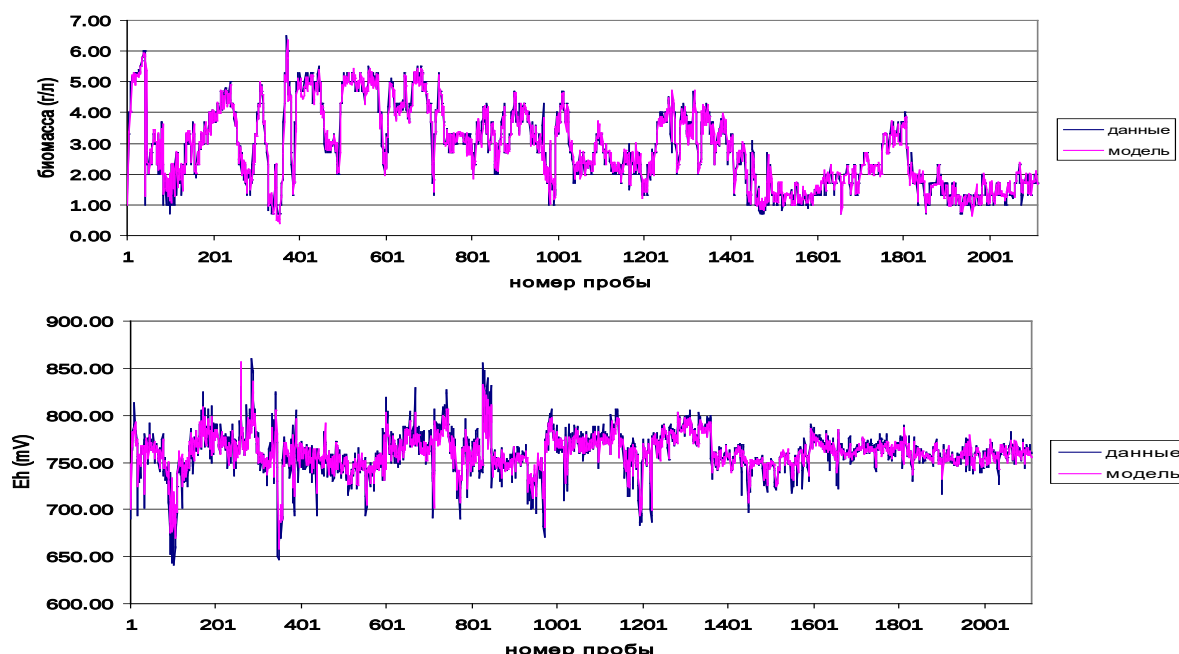


Рисунок 1 – Сравнение экспериментальных данных по динамике биомассы и окислительно-восстановительного потенциала (Eh) с результатами нейросетевого прогноза. Средняя относительная ошибка прогноза составляет для биомассы – 10,2%, Eh – 1,2%

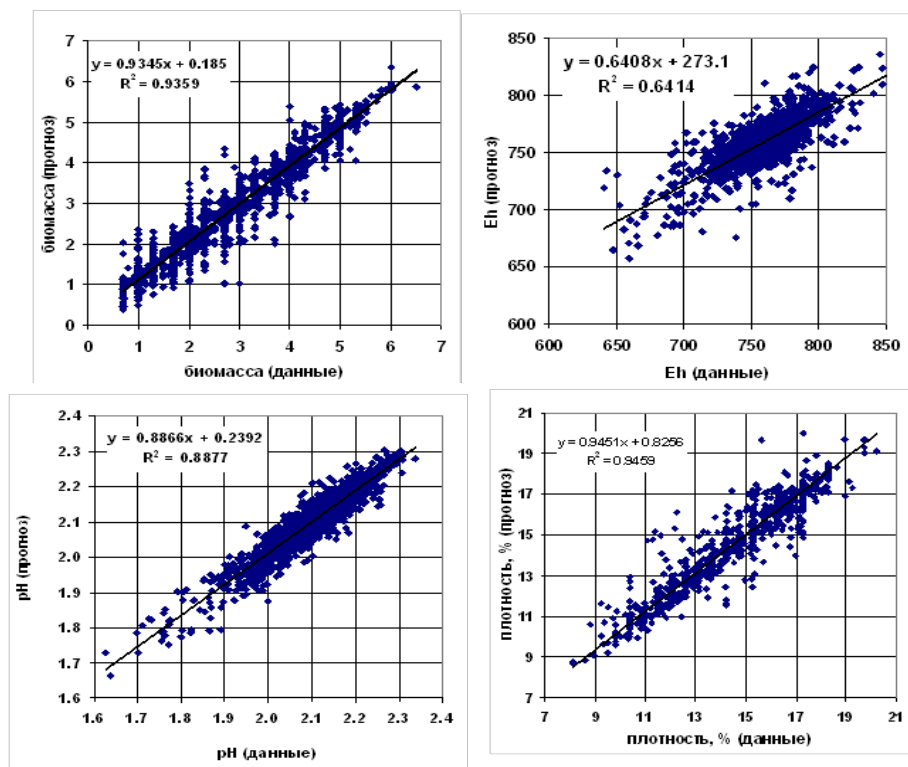


Рисунок 2 – Диаграммы соответствия между реальными данными и нейросетевым прогнозом

Заключение. Исследования показали, что построенная нейросетевая регрессионная модель позволяет осуществлять 12-ти часовой прогноз показателей процесса с известной точностью. Относительно невысокая сложность нейронной сети указывает на возможность построения достаточно простой механизменной модели процесса биовыщелачивания.

TRACE GAS FLUXES IN PERMAFROST ECOSYSTEMS

S. Evgrafova¹, O. Novikov^{1,2}, M. Meteleva¹, G. Guggenberger^{1,3}

¹ V.N. Sukachev Institute of Forest FIC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

³ Institute of Soil Science, Leibniz University of Hannover, Germany

E-mail: evgrafova@ksc.krasn.ru

Permafrost thawing may provoke a positive feedback to climate warming by causing increased greenhouse gas emissions. For example, a positive feedback of methanogenic communities to warmer periods in the Late Pleistocene and Holocene was shown for the Lena River Delta. Microbial degradation of organic matter in permafrost soils is the most important source for the greenhouse gases (GHG) CO₂ and CH₄.

The vulnerability of the large soil organic carbon pool in permafrost-controlled ecosystems [4] to increasing temperatures [2] is a key question in numerous studies conducted in Northern circumpolar regions, including the basins of the largest Siberian rivers [1].

Since permafrost impedes water drainage, water-saturated soils, ponds and lakes are widespread in the Arctic. Under water-saturated, anoxic conditions the end products of organic matter mineralization are carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄), which has a 34-fold global warming potential of CO₂ on a 100 year timescale. Further, mean annual temperatures are currently rising two times faster in the Arctic than the global average temperature [3]. This change is extending the growing season significantly and is likely to increase methane emissions from northern wetlands. It is thus important to develop ways of analyzing methane emissions from tundra and boreal soils, so that the northern inputs to the global budget can be specifically quantified.

Numerous laboratory studies and field-based experiments have been addressed to climate change effects, especially those of increasing temperatures on ecosystem structure and function. Generally, all natural soil heating experiments have been conducted in permafrost soils of tundra ecosystems or mostly permafrost-free forest environments in Northern America and Northern Europe. A fundamental research question related to the impact of thawing permafrost on global change is, how fast the soil organic matter (SOM) in the thawing permafrost can be mineralized to CO₂, CH₄ and how much of these produced GHG will be released into the atmosphere. Current estimates on the degradability of thawing organic matter in permafrost are based on incubation studies, which are highly artificial and probably overestimate the GHG production under *in situ* conditions. In this respect, the organic matter rich Holocene permafrost deposits are of particular interest, because current research indicates that they contain substantial amounts of labile organic matter, which will be the source for CO₂ and CH₄ after thaw. The basic research question is how fast the thawed organic matter can be mineralized under *in situ* conditions to CO₂ and CH₄.

To find out the microbial response and associated carbon release in gaseous forms (CO₂, CH₄) from organic matter that has been permanently frozen, we performed an *in situ* field-based incubation experiment in a rim of ice-wedge polygon on Samoylov island, Lena Delta, Russia (72°22'N, 126°28'E).

Materials and Methods. Samoylov is a typical Holocene island in the centre of the northeast Siberian Lena River Delta. The island is situated in the area of continuous permafrost and has a polar tundra climate, with mean annual air temperatures of -12.5°C and a mean annual

rainfall of about 125 mm. Due to the low temperatures, the soils are completely frozen for about 8 months per year and only during the summer months a shallow (<60 cm) surface layer (active layer) thaws enabling plant growth and microbial activity. The flat landscape of Samoylov is characterized by a microtopography of low centred ice-wedge polygons surrounded by elevated rims above the ice wedges. Since permafrost prevents water drainage, the depressed polygon centres are generally water saturated forming frequently shallow ponds of varying depth.

Field-based incubation experiment with “buried” organic matter has been installed in August, 2015. The principle includes that formerly frozen soil is moved to the active layer, but still residing in the subsoil. During July-August, 2016 soil respiration (CO_2 and CH_4 fluxes) was measured by a closed chamber technique [5]. The “buried” soil had relatively much organic matter (5.67% organic C and 0.24% total N), which, according to the wide C/N ratio of 23.5, was not much microbially transformed. This is also corroborated by the $\delta^{13}\text{C}$ ratio of -25.1 ‰ and $\delta^{15}\text{N}$ ratio of 1.77 ‰. Soil temperature was measured daily at noon using Campbell Data Logger that was permanently installed with 5 sensors in different soil depth, and air temperature was recorded during gas sampling using a weather station close by. The active layer thickness was measured manually by a permafrost stick.

Results. According to numbers of data collected during 15 vegetation seasons of monitoring in Samoylov island, the summer of 2016 was the coldest. Consequently, active layer thickness was < 50 cm even at the end of August, and soil temperature at 25 cm of depth varied between 1-2°C.

On Samoylov island monitoring of CH_4 soil efflux from rim and center of ice-wedge polygon have been carried out at permanently installed sites starting in May, 1999. In the summer 2016, CH_4 monitoring was continued. The mean value of CH_4 efflux from rim was $0.16 \pm 0.03 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, which was about 20 % lower than the values registered during the last 15 vegetation seasons of monitoring. The lower CH_4 flux rate was possibly due to the lower soil temperature over the 2016 season, thus reducing also the microbial activity.

In the field-based incubation experiment, the mean seasonal methane efflux from soil surface with the transplanted permafrost soil was $0.55 \pm 0.07 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; whereas the mean seasonal methane efflux from plots without buried organic material (i.e., disturbance control) was $0.50 \pm 0.02 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Hence, differences are minor. CO_2 emission measured by dark chambers did not differ in magnitude in all plots until beginning of August and then was approximately 1.5 times larger in plots containing organic material. The release of CO_2 from soil was mainly responding to soil temperature, as the Pearson's coefficient for correlation between heterotrophic respiration rate and soil and air temperature was $r=0.63$, $r=0.38$, respectively.

Hence, the soil organic matter properties of the buried soil are considered to be indicators for degree of decomposition. This soil material had a relatively large C:N ratio that probably caused low CH_4 release. Another reason could be that microbial assemblages, preadapted to an upper permafrost soil environment with low organic substrate availability, might not have yet adapted to the new environmental conditions following permafrost thaw and the availability of more organic-rich and less decomposed materials.

Conclusion. Differences between the mean seasonal methane efflux from soil surface with the transplanted permafrost soil, as measured in the vegetation period after experiment set up, and the mean seasonal methane efflux from plots without buried organic material (i.e., disturbance control) were minor. Input of “buried” organic material in the rim of ice-wedge polygon showed a little influence on methane emission during the whole vegetation period. Emission of CO_2 increased slightly during the second part of vegetation period. The release of CO_2 from soil was mainly responding to soil temperature. With this respect, we conclude that the heterotrophic part of microbial community needs some period for adaptation to chemical properties of introduced organic

matter (approximately 3-4 weeks). This suggests that the acceleration of carbon release due to thawing might not be very pronounced in soils of high latitudes due to the short vegetation period.

References

1. Frey, K.E. Amplified carbon release from vast West Siberian peatlands by 2100 / K.E.Frey, L.C. Smith // *Geophys. Res. Letters*. – 2005. – V. 32. – P. L09401.
2. Grosse, G. Vulnerability of high latitude soil organic carbon in North America to disturbance /G.Grosse, J.Harden, M.Turetsky[et al.] // *Journal Of Geophysical Research*. – 2011. – 116. – P. G00K06.
3. Rodrigues, J. The rapid decline of the sea ice in the Russian Arctic / J.Rodrigues // *Cold Reg. Sci. Technol*. – 2008. – V. 54. – pp. 124-142.
4. Tarnocai, C. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region / C.Tarnocai, J.G. Canadell, E.A. G. Schuur [et al.] // *Global Biogeochem. Cycles*. – 2009. – V. 23. – P. GB2023.
5. Wagner, D. Microbial controls on methane fluxes from polygonal tundra of the Lena Delta, Siberia / D.Wagner, S.Kobabe, E-M.Pfeiffer, H-W.Hubberten // *Permafrost Periglac Process*. – 2003. – V. 14. – pp. 173–185.

POTENTIAL OF BIOTECHNOLOGY FOR PROTECTING CROPS AND DECREASING YIELD LOSSES

T.G. Volova

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

Siberian Federal University, 79 Svobodny Ave., Krasnoyarsk, 660041, Russia

E-mail: Volova45@mail.ru

The effectiveness of agricultural technologies in food production is determined by various factors, including ecological, geographical, and economic ones; it also depends on renewable biological resources such as crops, domestic animals, and microorganisms. Considerable research effort in various sciences has focused on increasing the biological production in agriculture. Modern intensive farming is impossible without pesticides. The global losses of potential yields caused by pests reach 37%: 13% of them are due to insects, 12% due to weeds, and 12% due to diseases. The annual losses are assessed at U.S. \$2000 billion. However, pesticide build-up in the biosphere, via accumulation and concentration in food chains of biota in agroecosystems and natural ecosystems, poses global environmental threat. Thus, only a small part of pesticides in the environment reach their goal; the remaining pesticides kill useful organisms, accumulate in biological objects, destroy the balance in natural ecosystems, and contaminate soil, water, and air. The scale of pesticide application is very large and keeps on growing; at the beginning of the 21st century, the pesticide market approximated U.S. \$30 billion. Pesticide build-up in the biosphere, via accumulation and concentration in food chains of biota in agroecosystems and natural ecosystems, poses global environmental threat. Research is aimed at creation of pesticides with less toxic and more selective action and at decreasing their application rates. Thus, the wide use of products of chemical synthesis based on nonrenewable resources has led to an excessive and progressive increase in the amounts of unrecycled wastes, causing environmental concerns and posing a global environmental problem. A possible solution is the wider use of biotechnological tools and methods, which, on the one hand, protect useful biota and increase agricultural production and, on the other, decrease toxic impact on different ecosystems and the entire biosphere.

It is particularly important to develop pesticide formulations for protecting cereals and potato – an essential crop used as food and feed and in technical applications. Potato yield losses may reach between 13 and 30%. Therefore, studies aimed at developing effective formulations and technologies for controlling potato pests throughout the plant growing season have come to the fore. For measures aimed at protecting farm crops, including potato, to be effective, the methods and means used in every region must correspond to the climate, weather, and environmental conditions there. Thus, they should be thoroughly planned, taking into account all factors. The use of microorganisms as biopesticides is a relatively new line of biotechnology, but it can boast considerable achievements. Bacteria, fungi, and viruses have been increasingly used as commercial biopesticides. The processes involved in production of these pesticides vary greatly, as producing microorganisms have diverse origins and physiological properties. However, all biopesticides must meet certain requirements such as selectivity and high efficacy, safety for people and useful plants and animals, long lifespans, ease of use, good wettability, and good adhesive properties. In addition to antibiotics, about 50 microbial formulations – bacterial, fungal, and viral ones – are used now to protect plants and animals from insects and rodents. Integrated biological crop protection can extend the plant growing season by 2 weeks, increase cucumber and tomato yields to 5 kg/m², improve the sanitary conditions in greenhouses, enable production of health food, and lead to a 35% reduction in the cost of protective measures compared to pesticide use. Experts suggest that between 2014 and 2020, the world biopesticide market will develop at the fastest rate. Over 90 bacterial species infecting insects have been described by now. They mainly belong to the families *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae*, and *Bacillaceae*. Most of the commercial strains are of the genus *Bacillus*, and more than 90% formulations are based on *Bacillus thuringiensis* (Bt), which has more than 22 serotypes. Promising contact biopesticides are fungal preparations. Numerous species of entomopathogenic fungi commonly occur in nature; they affect a wide range of insects through various mechanisms, including contact, which makes them convenient to use. Fungi produce various bioactive substances, which enhance their pathogenic effect. Fungal preparations, however, are not used widely now.

The newest trend in research is development and agricultural use of environmentally safe new-generation pesticides with targeted and controlled release of active ingredients embedded in biodegradable matrices or covered with biodegradable coatings, which are degraded in soil and other biological media by soil microflora to form products that are harmless to living and nonliving nature and which are gradually released into the environment. The use of such formulations can reduce the amounts of the chemicals added to the soil and enable their sustained and controlled delivery over a growing season, preventing sharp releases into the environment that occur in the case of using free chemicals. The crucial part of constructing such preparations is the availability of appropriate materials with the following properties: degradability, ecological compatibility with the environment and global biospheric cycles; safety for living and nonliving nature; long-term (weeks and months) presence in the natural environment and controlled degradation followed by formation of non-toxic products; chemical compatibility with pesticides and fertilizers; processability by avail. Pioneering studies that provided a scientific basis for using PHAs to develop new-generation formulations were performed by researchers of the Institute of Biophysics SB RAS. Implementation of the project “Fundamental basis for constructing and using new-generation agrochemicals” (No. 14-26-00039) resulted in development of the scientific foundation for the new line in ecological and agricultural biotechnology, including development of technologies for constructing new-generation

slow-release formulations, construction and investigation of a series of fungicidal and herbicidal formulations and nitrogen fertilizers embedded in degradable polymer matrix.

The following results were obtained:

- the knowledge of conditions of interactions between chemicals and polyhydroxyalkanoates (PHAs) in different phase states and, based on this, development of methods of loading of the chemicals intended for suppressing agents of plant diseases and killing weeds and fertilizers into variously shaped polymer matrices;

- a series of experimental slow-release formulations produced using different methods; results of studying their structure and physical/mechanical properties;

- knowledge of the release kinetics of the active ingredients from the polymer matrix obtained in laboratory soil microecosystems as dependent on the geometry of formulations, concentrations of the chemicals in them, chemical composition of the soil, and the type of soil microbial community;

- positive evaluation of the effectiveness of using the slow-release chemical formulations in laboratory conditions: in soil ecosystems with known properties containing higher plants infected by plant pathogens and weeds.

In the final stage of the project implementation, we studied the effectiveness of the formulations developed during the research in laboratory ecosystems with plants, which contained the following model weeds and crops:

- weeds (a perennial grass species *Agrostis stolonifera* – creeping bentgrass, *Setaria macrocheata* – foxtail millet, *Chenopodium album* – lamb's quarters, *Melilotus albus* – white sweet clover, *Amaranthus retroflexus* – red-root amaranth);

- crops (lettuce *Latua sativa*, wheat *Triticum aestivum*);

- soil microecosystems infected by plant pathogens *F. moniliforme* and *F. solani* – root rot agents;

- crop *Triticum aestivum* infected by *Fusarium moniliforme* and weeds.

The studies showed that the slow-release herbicide and fungicide formulations developed during implementation of this project were effective against weeds and plant pathogens and that their effects were comparable with or stronger than those of free forms of agrochemicals.

Conclusions. Gradual release of nitrogen from the experimental nitrogen fertilizer formulations significantly reduces nitrogen losses. Positive results of the research project suggest that the use of natural polyesters, polyhydroxyalkanoates, as degradable polymer matrix for constructing slow-release formulations of agrochemicals is a useful approach and that the next step should be field tests of the experimental formulations. This study has produced new data on degradable PHAs as material for constructing slow-release formulations of agrochemicals. The scientific basis has been provided for constructing environmentally friendly and targeted controlled-release formulations of fertilizers and pesticides to protect crops against pests and pathogens. The development of this line of research will help mitigate the risk of accumulation and uncontrolled spread of xenobiotics in the environment and replace dead-end synthetic plastics by degradable materials capable of joining the biospheric cycles.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 14-26-00039).

HERBICIDAL ACTIVITY OF SLOW-RELEASE HERBICIDE FORMULATIONS IN WHEAT STANDS INFESTED BY WEEDS

N.O. Zhila^{1,2}, A.V. Murueva², A.M. Shershneva^{1,2}

¹Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Ave., Krasnoyarsk, 660041, Russia Federation

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

E-mail: nzhila@mail.ru

Herbicides constitute the largest group of pesticides. They are extensively used to control thousands of species of weeds, which cause the most serious damage to farm crops. Weeds compete with crops for light, water, and nutrients. Therefore, the use of herbicides to control weeds is one of the most important approaches in modern high-performance agriculture. Application of herbicides, however, inevitably leads to high concentrations of chemical compounds in soils, not only posing hazard to human health but also causing the development of species resistant to the herbicides, threatening the stability of agroecosystems, and endangering the long-term soil fertility. The major challenge in constructing slow-release pesticide formulations is to find proper materials to be used as a matrix and characterize them. Among materials investigated for this purpose are degradable polymers of various origins, including polyvinylchloride, alginates, chitin, cellulose, lignin/polyethylene glycol blends. Polymers of monocarboxylic acids – polylactides, polyglycolides, and polyhydroxyalkanoates (PHAs) – are also promising materials for constructing pesticide formulations. PHAs are microbial polyesters that are degraded in biological media by natural microflora to carbon dioxide and water under aerobic conditions and to water and methane under anaerobic ones. Production of this class of natural polymers is a rapidly developing branch of the industry of degradable bioplastics, and they are considered promising candidates for gradual replacement of synthetic polymers. In a number of recent studies, our team has described experimental slow-release formulations of herbicides and fungicides embedded in the degradable matrix of poly-3-hydroxybutyrate and their effects on weeds and plant pathogens – root rot agents – in laboratory soil microecosystems. Although more research has recently focused on new-generation slow-release targeted herbicide formulations, published studies mainly describe methods of embedding herbicides and materials used as matrices. Very few data can be found on the herbicidal efficacy of new formulations and outcomes of studies conducted with weed-infested crops.

The purpose of this study was to investigate herbicidal activity of slow-release metribuzin and tribenuron-methyl formulations in wheat stands infested by weeds.

Materials and Methods. P(3HB)/MET formulations were prepared as films and microparticles loaded with MET at 25% (of the mass of the polymer matrix). Herbicidal activity of the experimental formulations was studied in laboratory ecosystems: 500-cm³ plastic containers filled with 500 g field soil were used to grow higher plants. The agrogenically-transformed soil (collected at the village of Minino, the Krasnoyarsk Territory, Siberia, Russia) was placed into 250-mm³ plastic containers (200 g soil per container). Soft spring wheat (*Triticum aestivum*, cv. Altaiskaya 70) was used as the crop, and white sweet clover *Melilotus albus* was the weeds. Wheat plants and weeds were photographed every week to monitor their state and growth. Indicators of the herbicidal activity of the experimental formulations were the time and the rate of death of the weeds, which were estimated from the amounts of their aboveground biomass and plant density per unit area. Indicators of the state of the wheat plants affected by weeds were their estimated productivity and measured aboveground fresh green biomass.

Results. Herbicidal activity of slow-release metribuzin formulations, with the herbicide embedded in the degradable polymeric matrix of poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)/MET] shaped as films and microgranules, was studied in wheat stands infested with the weed – white sweet clover.

The state of the wheat plants and results of weed suppression during the 50-day experiment are shown in Figure.

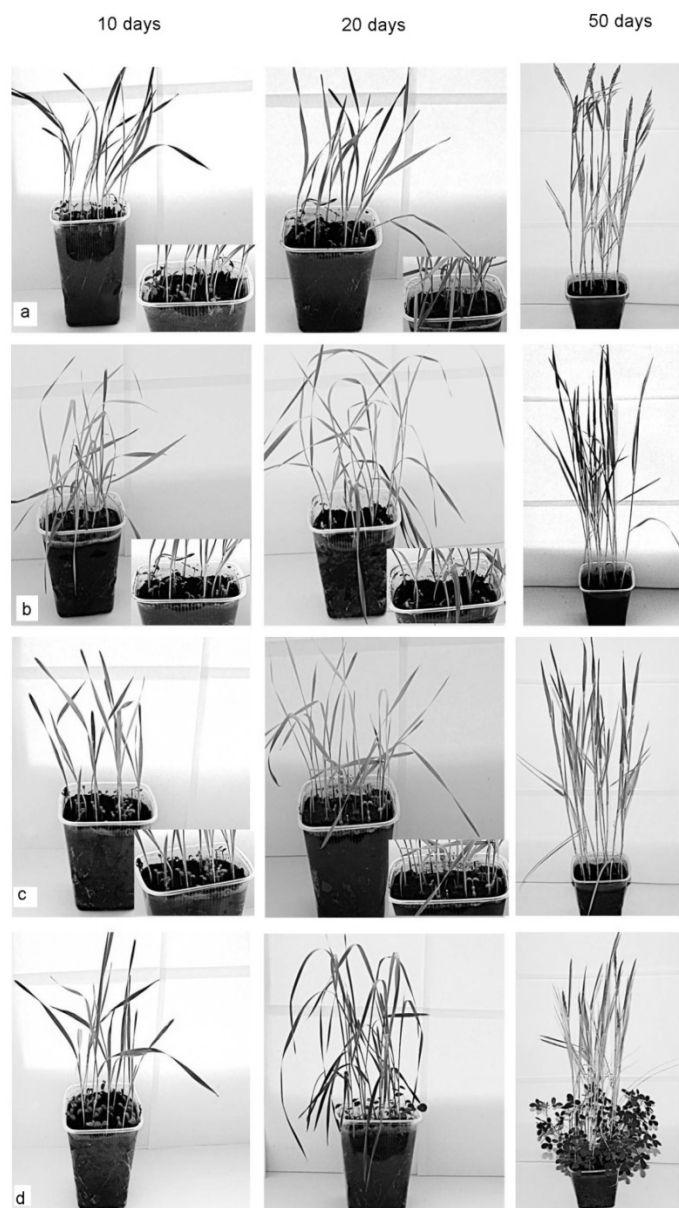


Figure. Photographs of wheat (*Triticum aestivum*) stands infested with white sweet clover (*Melilotus albus*) and treated with different P(3HB)/MET formulations: *a* – microgranules, *b* – films, *c* – positive control (Sencor Ultra), *d* – negative control (untreated)

The most noticeable effect was achieved by using experimental P(3HB)/MET formulations: the biomass of the wheat vegetative organs reached 198.6 and 182.1 g/m² in the treatments with P(3HB)/MET films and microgranules, respectively. These values were higher than in the positive control (free herbicide) (168.6 g/m²). These results suggest the effectiveness of using experimental formulations of metribuzin embedded in the matrix of degradable poly-3-hydroxybutyrate.

Table illustrates herbicidal effects of metribuzin delivered to plants in different formulations. In 10 days after sowing, the density of the white sweet clover plants and their biomass in the control (without application of the herbicide) reached 6537 plants/m² and 9.8 g/m², respectively. Those values were significantly higher than the corresponding values in the positive control (5185 plants/m² and 5.1 g/m²) and treatments (4352-5556 plants/m² and 4.3-6.1 g/m²),

where the weed development was evidently inhibited. In 20 days after sowing, the effect was more pronounced; a great number of clover plants died, and their density dropped to 1481 and 1790 plants per m² in the ecosystems with P(3HB)/MET films and microgranules, respectively; in the positive control, the weed density was somewhat higher (2037 plants/m²). The amount of clover biomass in the treatment groups had dropped to values that were an order of magnitude lower than the corresponding value in the negative control. At the end of the experiment, at Day 50, no white sweet clover plants were observed in any of the herbicide-treated ecosystems. It is important that the clover plant density and the amount of the weed aboveground biomass were significantly lower in the ecosystems with the two experimental formulations – P(3HB)/MET films and microgranules – than in the ecosystem with the commercial formulation. Effective weed control caused an increase in wheat productivity. At Day 50, in the negative control group, with no herbicide application, wheat biomass increased to 135.5 g/m². That was considerably lower than in the herbicide-treated ecosystems (Table).

Table – Density and dry biomass weight of wheat (*Triticum aestivum*) and white sweet clover (*Melilotus albus*) plants in laboratory soil ecosystems treated with different formulations of the herbicide metribuzin

Type of formulation	Dry biomass of wheat (g/m ²)			Density of wheat (plants/m ²)		
	10 days	20 days	50 days	10 days	20 days	50 days
Films	20.6±1.1	90.8±10.0	198.6±11.3	1852	1852	1852
Microgranules	24.5±1.9	107.9±8.3	182.1±9.9	1852	1852	1852
Control(-)	23.9±1.5	105.3±6.3	135.5±6.4	1852	1852	1852
Control (+)	23.1±1.9	101.4±7.5	168.6±10.3	1852	1852	1852
Dry biomass of clover plants (g/m ²)				Density of clover plants (plants/m ²)		
Films	4.3±0.2	1.9±0.1	-	4352±51	1481±37	-
Microgranules	6.1±0.4	1.3±0.1	-	5556±61	1790±32	-
Control(-)	9.8±0.4	14.7±0.4	90.5±6.4	6537±85	6537±85	6537±85
Control (+)	5.1±0.2	2.1±0.1	-	5185±77	2037±67	-

Conclusion. The study showed the effectiveness of using experimental formulations of metribuzin embedded in the degradable matrix of poly-3-hydroxybutyrate in weed-infested wheat stands. Results of this study suggest that degradable poly-3-hydroxybutyrate is a promising material for constructing pre-emergence slow-release herbicide formulations.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 14-26-00039).

РАЗДЕЛ 2.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

THE PHAome

George Guo-Qiang Chen

School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

E-mail: chengq@tsinghua.edu.cn

Polyhydroxyalkanoates (PHA) is a family of diverse biopolyesters synthesized by many natural or engineered bacteria. Like the well established genomics, transcriptomics or proteomics that contain different arrangements of nucleotides or amino acids in DNA, RNA or protein polymer chains, PHA that contain different arrangements of various monomers can be called PHAomics. Unlike the above well-known – omics, the PHAomics contains also homopolymers of one monomer, random copolymers of two or more than two different monomers, and block copolymers of at least two homopolymers connected by covalent bond(s). The hydroxyl- group can be located in 2- to 5-position of the alkanoic acids depending on how long the fatty acids are. The oxygen in hydroxyl group can also be replaced by sulfur to become a polythioester. In addition, functional groups such as double bonds, triple bonds or benzene ring can be incorporated into the PHA side-chain to form functional PHA that can be chemically modified to become different polymers. Furthermore, PHA having ultrahigh molecular weights or very low molecular weights exhibit different properties that may have some high values to expect. The diversity of PHA can be obtained by engineering the in situ fatty acid synthesis and/or fatty acid beta-oxidation cycle. The PHA synthase specificity also plays a key role in deciding the PHA structures. The supply of sufficient materials from the PHAomics will promote the discovery of new properties and new applications of these types of advanced materials.

SUSTAINABLE BIOCOMPOSITES FOR STRUCTURAL APPLICATIONS: CHALLENGES AND OPPURTUNITIES

Prof. Kuruvilla Joseph

Department of Chemistry Indian Institute of Space Science and Technology (IIST)

Dept. of Space, Govt. of India

Valiamala, Thiruvananthapuram- 695547

E-mail: kjoseph.iist@gmail.com; kuruvilla@iist.ac.in

Increased environmental awareness and societal needs serve as a catalyst for developing new eco-friendly materials like green composites. Today fibre composites are replacing traditional petroleum based products such as resins in thermoset plastics, which are toxic and non-biodegradable. Composites with natural fibres have the potential to be attractive alternative to synthetic fibre composites. In the case of “Green” composites, natural fibres derived from bamboo, hemp, or flax are being added to biodegradable resins, to reinforce polymer matrix materials and improve the mechanical properties of resulting composites. In recent years there has been considerable interest in using natural plant fibres as reinforcements for plastics. The motivation includes cost, performance enhancement, weight reduction, and environment concerns. The natural fibre-reinforced polymer composites are growing rapidly due to many advantages over traditional composites. Fibre-reinforced composites have been used for many applications such as aerospace, automotive parts from sporting goods, circuit boards, etc. Most commercially produced fibre-reinforced composites use petroleum based or synthetic fibres and resins that are non-degradable.

Green composite combines plant fibres with natural resins to create natural composite materials. The advantages of natural fibre over synthetic are low cost, low density, acceptable specific strength properties, ease of separation, carbon dioxide sequestration, and biodegradability.

Recent advances in genetic engineering, natural fiber development and composite science offer significant opportunities for improved value-added materials from renewable resources with enhanced support of global sustainability. Biodegradable polymers produced from renewable resources such as plants, animals and microbes through biochemical reactions offer a convenient and environment-friendly solution to the problem of plastic waste leading to Green computing or ICT Sustainability.

TWILD-TYPE MICROORGANISMS AS DEGRADERS OF NATURAL POLYMERS AND TRANSFORMATION OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHAs) IN THE ENVIRONMENT

**Christopher Brigham¹, Jean Huang², Morgan Zhu², Tamunonengiyeofori Charles-Ogan¹,
Lucy McCully³, Mark Silby³**

¹*Department of Bioengineering, ³Department of Biology, University of Massachusetts Dartmouth,
285 Old Westport Road, North Dartmouth, MA, USA*

²*Franklin W. Olin College of Engineering, 100 Olin Way, Needham, MA, USA*
E-mail: cbrigham@umassd.edu

There has been much interest over the past several decades in fermentatively producing biological polymers with properties similar to well-known, chemically-synthesized polymers (*e.g.*, polyethylene, polypropylene). A key facet of many bio-based polymers is biodegradability. Unlike chemically-synthesized, petroleum-based plastics, biopolymers can be composted and will persist in the environment for a much shorter period of time than synthetic polymers. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are one such type of biopolymer. PHAs have been actively studied by many prominent research groups as alternatives to traditional plastic raw materials. The biology of production [1] and degradation [2], as well as key physicochemical properties of PHAs [3] have been the focus of many investigations, all in an effort to provide a cost-effective production method for a sustainable polymer.

Many chemically-synthesized polymers, in particular those produced by free radical addition reactions, possess highly reduced chemical structures, suggesting that environmental degradation of these polymers is unlikely. Most environmental organisms do not have the capacity to utilize highly reduced compounds, and those that can use these compounds as carbon sources cannot do so rapidly. Thus, these highly reduced polymers persist in the environment indefinitely. Bio-based polymers like PHAs have less reduced chemical structures and, moreover, are synthesized by reaction mechanisms that are common in many organisms (*i.e.*, condensation polymerization). Polymers like PHAs can be broken down in the environment by specific, as well as non-specific, biochemical processes. It is reasonable to assume that most organisms that are capable of synthesizing PHAs are also capable of breaking down these polymers. Intracellularly, PHA-producing microorganisms express dedicated esterase genes that can depolymerize PHA to its requisite monomer or another similar compound from which the cell can derive carbon and energy. PHA can clearly be degraded extracellularly, as many studies have shown. There is some evidence of microorganisms that produce dedicated extracellular PHA depolymerases, but generally PHA breakdown is performed non-specifically by extracellular lipase or esterase enzymes that are expressed by a variety of environmental organisms. Many organisms have been isolated from diverse environments and have been shown to break down PHAs. Developing a greater understanding of environmental isolates and how these organisms metabolize PHA can help us better understand the fate of these biopolymers in the environment and, on a larger scale, the global carbon cycle.

Aim. Isolation and preliminary characterization of environmental microorganisms that can grow on PHA as the main carbon and energy source is an ideal educational project in microbial ecology. The aim of this study is to elucidate the basic physiology of PHA-degrading microorganisms.

Materials and Methods. Chemicals, including most microbiological growth media components, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tryptic soy broth was purchased from Fisher Scientific (Agawam, MA, USA).

A novel organism, *Ralstonia* sp. MD27, was isolated from a greenhouse compost pile [4]. The organism was isolated based on its ability to grow on polyhydroxybutyrate (PHB) as the main carbon and energy source. *Ralstonia* sp. MD27 was grown at 30°C. Tryptic soy broth (TSB) was used as rich media. Minimal growth media for examination of various carbon sources was formulated as described previously [1].

Genomic DNA of *Ralstonia* sp. MD27 was extracted using Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit. Genomic libraries were then generated using Illumina Nextera XT sequencing preparation kit and sequenced by an Illumina MiSeq at Tufts University Genomics Core Facility (Boston, MA, USA) [4]. The genome was annotated using the NCBI PGAP pipeline. Phylogenetic analysis was performed on a 16S rDNA sequence from MD27 and a representative group of 16S rDNA sequences from other representative Burkholderiaceae species and strains.

Results. Robust growth of *Ralstonia* sp. MD27 was observed in minimal media with glucose and fructose as the main carbon sources. Surprisingly, the amino sugar *N*-acetyl glucosamine was not a good carbon or energy source for MD27 as slow growth was observed over the course of 90-h culture time. More robust growth was observed when crystalline PHB was provided as the main carbon source. Therefore, *Ralstonia* sp. MD27 is capable of breaking down extracellular PHB and using the resulting breakdown products for growth.

The draft genome sequence of *Ralstonia* sp. MD27 comprises 5,917,320 bp with a G/C content of 63.6%. Four putative PHA depolymerase (*phaZ*) genes were identified in the genome, three intracellular depolymerase genes and one extracellular PHB depolymerase gene. Since the organism is capable of growth using PHB as the main carbon source, the extracellular *phaZ* gene and its putative protein product were examined more closely. The translated PhaZ sequence was used as a seed for a BLAST search with the Depolymerase Engineering Database (DED, <http://www.ded.uni-stuttgart.de>). Using this resource, the extracellular PhaZ product of MD27 is categorized as a PHA depolymerase with a type I catalytic domain with substrate specificity for extracellular, denatured short chain length PHA. Experimentally validated PHA depolymerases that also fall into this category include the PhaZ from *Ralstonia pickettii*, which has been demonstrated to bind to and degrade PHB *in vitro* [5]. We hypothesize that the extracellular PhaZ is expressed by *Ralstonia* sp. MD27 and used to enzymatically break down crystalline, extracellular PHB.

Conclusion. By characterizing environmental isolates that degrade PHAs, we can engineer a “super composter” microbial consortium that can rapidly degrade the polymer and products made from it, thus minimizing the persistence of PHA in the environment. *Ralstonia* sp. MD27 could be a part of this consortium. The next step is to elucidate the pathway of PHB degradation. Examination of the role of the extracellular PHB depolymerase gene and its protein product could demonstrate the utility of the organism in degradation of the different types of polymer. These studies are excellent for the undergraduate student laboratory.

References

1. Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. Appl Environ Microbiol 2011 May; 77(9):2847-2854.

2. Brigham CJ, Reimer EN, Rha C, Sinskey AJ. Examination of PHB Depolymerases in *Ralstonia eutropha*: Further Elucidation of the Roles of Enzymes in PHB Homeostasis. *AMB Express* 2012 Apr 26;2(1):26-0855-2-26.
3. Kehail A, Foshey M, Chalivendra V, Brigham C. Thermal and mechanical characterization of solvent-cast poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *J. Polym Res* 2015; 22:216.
4. Zhu M, McCully LM, Silby MW, Charles-Ogan TI, Huang J, Brigham CJ. Draft Genome Sequence of *Ralstonia* sp. MD27, a Poly(3-Hydroxybutyrate)-Degrading Bacterium, Isolated from Compost. *Genome Announc* 2015 Oct 8;3(5):10.1128/genomeA.01170-15.
5. Hiraishi T, Hirahara Y, Doi Y, Maeda M, Taguchi S. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. *Appl Environ Microbiol* 2006 Nov;72(11):7331-7338.

PROPERTIES OF PHA BI-, TER-, AND QUARTER-POLYMERS CONTAINING 4-HYDROXYBUTYRATE MONOMER UNITS

N.O. Zhila

Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Avenue, Krasnoyarsk, 660041, Russia

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

E-mail: volova45@mail.ru

Of the various PHAs, poly(3-hydroxybutyrate/4-hydroxybutyrate) copolymers [P(3HB/4HB)] deserve special attention. They are elastomeric materials with enhanced elongation and tensile strength. The first products approved by the FDA for clinical uses were P(3HB/4HB)-based devices designed by Tepha (U.S.) (<http://www.tepha.com/pipeline-drugdelivery.htm>). P(3HB/4HB) copolymers can be synthesized by both wild-type and genetically modified strains under specialized cultivation conditions, in the culture medium supplemented with such precursors of 4-hydroxybutyrate (4HB) monomers as γ -hydroxybutyric acid, γ -butyrolactone, 1,4-butanediol, etc. These substances, however, inhibit the growth of microorganisms, decreasing cell biomass production, total copolymer yields, and the 4HB fraction of the copolymer. Therefore, there are only relatively limited data available regarding the properties and potential for wide-scale application of these copolymers. Published studies mainly report results of synthesis and investigation of P(3HB/4HB) copolymers comprising two components, with different 4HB fractions. A number of papers addressed the effect of 4HB monomer concentration on the temperature and molecular-weight characteristics of P(3HB/4HB) copolymers and their mechanical properties. There are few published data on PHA terpolymers containing 4HB. Several studies described poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate/4-hydroxybutyrate) [(P(3HB/3HV/4HB))] copolymers with different monomer fractions and their temperature and molecular-weight properties. Until recently, no data on the properties of PHA quaterpolymers containing 4HB monomer units have been found in the available literature.

The purpose of this study was to investigate and compare physical, mechanical, and biological properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing various concentrations of 4HB.

Materials and Methods. Samples of PHAs of different composition were synthesized by using *Cupriavidus eutrophus* B10646 wild strain, at the Institute of Biophysics SB RAS. Cells were batch-cultured under strictly aseptic conditions, following the previously developed technology. PHAs of different compositions were synthesized using precursor substrates such as valeric acid,

hexanoic acid and γ -butyrolactone. Polymer was extracted from cells with chloroform, and the extracts were precipitated using hexane. The extracted polymers were re-dissolved and precipitated again 3-4 times to prepare homogeneous specimens.

Results. Strain *Cupriavidus eutrophus* B10646 cultivated under specialized conditions of carbon nutrition synthesized polymers with different proportions of 4HB monomer units: P(3HB/4HB) bipolymers with 4HB 10.4-75.0 mol.% (3HB constituting the other fraction); P(3HB/3HV/4HB) terpolymers with 4HB 28.7-55.6 mol.% (with 3HV 10.1 -20.5 and 3HB 27.4-51.5 mol.%), and poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate/4-hydroxybutyrate/3-hydroxyhexanoate) [(P(3HB/3HV/4HB/3HHx)] quaterpolymers with 4HB 9.3 – 13.3 mol.% (with 3HV 6.4 -20.9, 3HHx 1.4-2.5, and 3HB 63.9-82.9 mol.%) (Table 1). The chemical composition of monomers in the PHAs was identified using NMR spectrometry.

Table 1 – Chemical composition and physicochemical properties of PHA copolymers with different proportions of monomers

Specimen no.	PHA composition, mol.%				M_w , kDa	M_n , kDa	D	C_x , %	T_g , °C	T_c , °C	T_{melt} , °C	T_{degr} , °C
homopolymer of poly(3-hydroxybutyrate)												
	P(3HB) 100				920	368	2.5	67	n.d	107	178	295
PHA bipolymers 3HB/4HB												
11	89,6		10.4		570	150	3.8	53	3.4	66	150	297
22	85.0		15.0		750	250	3.0	50	-2.6	57	158	296
33	70.7		29.3		830	220	3.8	46	n.d.	96	162	298
44	43.9		56.1		770	190	4.1	40	n.d.	97	162	299
55	25.0		75.0		700	150	4.7	30	n.d.	88	158	295
PHA terpolymers 3HB/3HV/4HB												
56	50.8	20.5	28.7	580	180	3.2	35	-5	64	166	278	
7	51.5	10.1	38.4	490	170	2.9	33	-5	61	164	280	
8	27.4	17.0	55.6	540	160	3.4	26	n.d.	25	166	296	
PHA quaterpolymers 3HB/3HV/4HB/3HHx												
9	63.9	20.9	13.3	1.9	790	150	5.3	45	-0.7	51	169	292
10	74.7	12.7	10.1	2.5	580	130	4.5	44	-3.1	70	165	290
11	82.9	6.4	9.3	1.4	760	150	5.1	39	-4.4	63	161	289

n.d. – non detected

Results of studying the microstructure and physical/mechanical properties of polymer film are shown in Fig. and Table 2. SEM images of the samples prepared from polymers with different chemical composition and differing in their physicochemical properties looked dissimilar; the surfaces of copolymer films, in contrast to the surface of P(3HB)-based ones, were developed (to different degrees), porous, and uneven. The surface of the P(3HB) films was smoother and denser, with a few small pores, of diameter of no more than 0.5 μm . The surface structure of the films prepared from bipolymers was noticeably different from the surface structure of P(3HB) film in that it was rougher and had pores of diameter between 0.5 and 5 μm and prominent circular structures. The surface of the films prepared from terpolymers and quaterpolymers was also rougher, with very many pores of different diameters (between 0.5 and 6 μm).

Table 2 – Physical/mechanical properties of films prepared from PHAs with different compositions (numbers according to Table 1)

Specimen no.	Tensile strength, MPa	Young's modulus, MPa	Elongation at break, %	Ra – arithmetic average of the roughness profile, nm	Rq – root mean squared roughness, nm
P(3HB)	20.9	1764.0	3.2	71.8	80.3
1	14.8	975.7	5.7	92.9	113.1
3	7.8	242.9	30.7	177.6	248.1
5	15.4	424.8	323.4	568.2	681.1
7	5.3	130.5	47.6	126.5	170.7
8	8.8	34.3	365.4	184.5	221.8
9	7.3	127.8	93.7	132.5	172.9

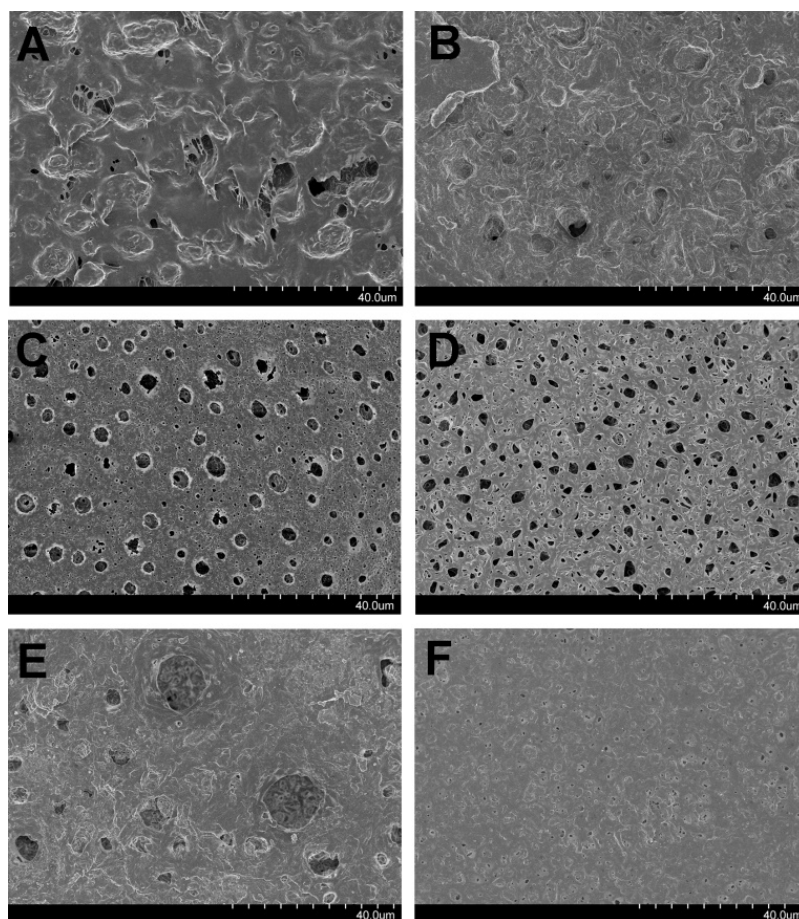


Figure – SEM of microstructure of polymer films: A – P(3HB/29.3 mol.%-4HB), B – P(3HB/75.0 mol.%-4HB), C – P(3HB/10.1 mol.%-3HV/38.4 mol.%-4HB), D – P(3HB/17.0 mol.%-3HV/55.6 mol.%-4HB), E – P(3HB/20.9 mol.%-3HV/13.3 mol.%-4HB/1.9 mol.%-3HHx), F – P(3HB)

Conclusion. Copolymers containing 4HB were more ductile than homogenous P(3HB): their values of elongation at break were higher than that of P(3HB). However, their mechanical strength was lower. All copolymers containing 4HB were highly biocompatible and suitable for fabricating cell scaffolds for cellular and tissue engineering.

ГЛИЦЕРИН КАК СУБСТРАТ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА РАЗРУШАЕМЫХ БИОПЛАСТИКОВ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

А.В. Демиденко¹, Д.А. Сырвачева¹, Е.Г. Киселев^{1,2}

¹Институт биофизики СО РАН (ФИЦ "КНЦ СО РАН"),

г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50. Россия

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

E-mail: kraysolnca@mail.ru

Принцип доступности сырья является одним из основополагающих при биотехнологическом производстве целевых продуктов. Это позволяет реализовать замену ростовых субстратов без существенного изменения технологического процесса и получать продукты для различных сфер применения. Привлекательность биотехнологических процессов связана не только с возможностью синтеза широкого спектра ценных биомолекул пищевого, технического и медицинского назначения, но и с возможностью привлечения для этого широкого спектра индивидуальных С-соединений, а также отходов различного происхождения.

Разрушаемые полигидроксиалканоаты (ПГА) синтезируют природные прокариоты или генетически модифицированные штаммы с привлечением различных субстратов, - индивидуальных соединений, среди которых сахара, органические кислоты, спирты и т. д, а также отходы производств сахара, пальмового масла, мясомолочной, спиртовой, фармацевтической промышленности, гидролизаты растительных отходов и др.

Расширение масштабов производства и применения полигидроксиалканоатов в настоящее время лимитируются их стоимостью. В связи с тем, что при производстве ПГА до 40-45 % затрат приходится на долю углеродного субстрата, поиск доступных источников углерода – актуальная задача технологии производства этих ценных полимеров.

Продуктивные технологические процессы биосинтеза ПГА, разработанные и реализованные в Институте биофизики СО РАН, ориентированы на использование различных ростовых субстратов, среди которых газовые смеси диоксида углерода и водорода; синтез-газ, получаемый конверсией природного газа, газификацией бурых углей и гидролизного лигнина [1,2]; сахара (фруктоза, глюкоза), органические кислоты, жироподобные субстраты, включая растительное масло [3,4].

Сравнительно недавно в качестве перспективного биотехнологического субстрата рассматривают глицерин, масштабы производства которого в настоящее время возрастают. Связано это с ростом производства биодизеля как альтернативного нефти возобновляемого источника энергии [5]. При получении биодизеля переэтерификаций жироподных субстратов сырой глицерин является побочным продуктом. Очищенный глицерин является важным сырьем для пищевой, косметической, фармацевтической промышленности, но процессы его получения весьма затратны, поэтому заводы небольшой производительности экономически не оправданы. Сырой, неочищенный глицерин, являющийся побочным продуктом при возрастающих объемах производства биодизеля, перспективен в качестве источника углерода для ряда технологических процессов с целью получения 2,3-бутандиола; 1,3-пропандиола; янтарной кислоты и с недавних пор – полигидроксиалканоатов. К настоящему времени исследованы процессы синтеза ПГА природными и рекомбинантными штаммами в различных культивационных условиях с выходами по полимеру от 20-40 до 60-80 % [5].

Цель работы – исследование процесса синтеза ПГА на глицерине природными штаммами водородокисляющих бактерий.

Материалы и методы. В качестве ростового субстрата использовали глицерин «ч». Бактерии *Ralstonia eutropha* В-5786 и *Cupriavidus eutrophus* В-10646 выращивали в периодическом режиме с использованием стеклянных колб объемом от 0,5 до 2,0 л в

шейкере инкубаторе «Incubator Shaker Innova®» («New Brunswick Scientific», США). Для масштабирования процесса применяли ферментер объемом 30 л с коэффициентом заполнения 0,6 «Bioengineering NLF 22» (Швейцария)

Результаты. Исследуемые штаммы бактерий – продуценты ПГА, ранее выращиваемые на сахарах, при замене их глицерином не сразу утилизировали новый субстрат, а после лаг-фазы, длительность которой составляла до 20-24 ч. Варьирование исходной концентрации глицерина в среде от 5 до 20 г/л и пересевы культур в течение нескольких десятков циклов сопровождалось адаптацией бактерий к глицерину и сокращением длительности латентного периода до полного его исключения. В колбочной культуре урожаи по биомассе клеток составили до 6-8 г/л, это сопоставимо с показателями на сахарах. Концентрация поли-3-гидроксibuтирата в клетках составляла от 50-60 до 70 %. Более продуктивным признан штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646, который был использован для масштабирования процесса.

Реализован массовый процесс биосинтеза в 30-ти литровом ферментере при рабочем объеме 18 л и стартовой концентрации клеток в инокуляте 2 г/л в двустадийной культуре при лимитировании роста клеток дефицитом азота на первом этапе в течение 24 ч и в безазотной среде – на втором этапе. Стартовая концентрация глицерина в культуре составила порядка 30 г/л; текущую концентрацию этого субстрата в культуре поддерживали на уровне 5-10 г/л при подаче в культуру глицерина перистальтическим насосом дозатором. Ферментационный цикл в течение 48 ч обеспечил урожай биомассы бактерий *C.eutrophus* B-10646 до 70-75 г/л при выходах полимера не ниже 65-70%.

Заключение. Штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 адаптирован к глицерину как основному ростовому С-субстрату в режиме синтеза поли-3-гидроксibuтирата. Достигнутые при масштабировании процесса биосинтеза выходы полимера и урожай биомассы клеток сопоставимы с продукционными характеристиками штамма на глюкозе.

Литература

1. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J. Degradable polymers: production, properties, pplications. NY: Nova Science Pub. Inc.. 2013. 380 p.
2. Volova T., Kiselev E., Shishatskaya E., Zhila N., Boyandin A., Syrvacheva D., Vinogradova O., Kalacheva G., Vasiliev A., Peterson I. Cell growth and PHA accumulation from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. Bioresource Technology. 2013. Vol.146. P.215-222.
3. Volova T.G., Kiselev E.G., Vinogradova O.N., Nikolaeva E.D., Chistyakov A.A., Sukovatyi A.G., Shishatskaya E.I. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. Plos One. 2014. V. 9. №2. P. 1-15.
4. Zhila N.O., Kalacheva G.S., Volova T.G. Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. Process Biochemistry. 2015. V. 50. P. 69–78.
5. John A. Posada et al. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. Process Biochemistry.2011. V. 46.P. 310–317

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ПИЛОТНОГО ПРОИЗВОДСТВА РАЗРУШАЕМЫХ БИОПЛАСТИКОВ

Н.А. Троегубова, А.В. Демиденко, Е.Г. Киселев

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

E-mail: evgeniygek@gmail.com

Биотехнологические производства в зависимости от назначения получаемых продуктов выдвигают различные требования к проблеме контаминации, как процесса ферментации, так и технологии в целом. В ходе реализации биотехнологических производств продуктов медицинского и биологического назначения, необходимо решать комплекс технологических задач, существенное место среди которых занимают микробиологический контроль и меры, исключающие контаминацию культуры и продукта. Микробиологический мониторинг и комплекс мероприятий обеспечивают надлежащий микробиологический статус производства, а также являются обязательным условием обеспечения общего контроля и управления биотехнологическим процессом. Важность данных мероприятий обусловлена необходимостью обеспечения отсутствия контаминации производственной культуры на всех стадиях биосинтетических процессов, гарантирующих получение целевого продукта высокого качества

Целью работы было обеспечение и контроль микробиологического статуса опытного производства биodeградируемых биопластиков (полигидроксиалканоатов) в соответствии с требованиями международных и российских нормативных документов.

В задачи исследования входило: 1) Проведение микробиологического контроля на стадиях производства полимерного материала биомедицинского назначения – полигидроксиалканоатов (ПГА): предферментационной, ферментационной, постферментационной. 2) Определение факторов и источников микробной контаминации, приводящих к нарушению биотехнологического процесса. 3) Разработка программы рекомендаций по предупреждению и устранению микробной контаминации.

Результаты. Проведен микробиологический контроль на стадиях производства полигидроксиалканоатов (ПГА): предферментационной, ферментационной, постферментационной; получена оценка микробиологического состояния производственной зоны и процесса получения продукта. Определены источники и ключевые факторы возможной микробной контаминации, среди которых гигиеническое состояние производственной среды (воздуха, помещений, поверхностей и технологического оборудования), входных потоков компонентов питательных сред и инокулята, санитарно-гигиенического состояния и правил работы персонала. Разработаны корректирующие действия по предупреждению и устранению возможной микробной контаминации, главными из которых являются штатное функционирование фильтрационных систем воздухо- и водоочистки, регламентированные правила уборки и дезинфекции производственных помещений, санитарно-гигиеническое состояние и работа персонала. Разработана программа микробиологического мониторинга и контроля опытно-промышленного производства биodeградируемых полигидроксиалканоатов с определением объектов и методов исследования, планом отбора проб, а также установлением критического уровня содержания микроорганизмов. На основе анализа микробиологического мониторинга состояния всех стадий биотехнологического получения ПГА и разработанной программы ведения процесса обеспечены микробиологический статус и условия функционирования опытного производства в соответствии с требованиями нормативных документов.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ПГА ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ ПО ВХОДНЫМ ПАРАМЕТРАМ (ТЕМПЕРАТУРА И ВРЕМЯ)

С.В. Барановский¹, С.Ю. Воронина^{1,2}, О.Д. Петровская¹, О.Д. Петровская¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет»,
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева»

Россия, 660037, Красноярск, пр. им. газеты Красноярский рабочий, 31

E-mail: simkina_svetlana@mail.ru

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют перспективную группу полимеров, являющимися биологически совместимыми, термопластичными и не токсичными, что делает их пригодными для различных областей применения в промышленности, медицине, сельском хозяйстве и других сферах [1]. Для медицины и научных исследований важное значение имеет чистота биополимера. Очистка полимера от примесей и липидных загрязнений влечет дополнительные затраты для процесса экстракции, которые могут составлять до 50 % от стоимости ПГА, поэтому значительную роль в общей стоимости производства ПГА играет способ выделения полимера из клеточной биомассы [2].

Снижение стоимости процесса экстракции ПГА является актуальной задачей для практической применимости технологии. Реализация многофакторного эксперимента позволит оценить влияние различных параметров на выходные характеристики продукта и обеспечить максимальный выход продукции с минимальными затратами. Поэтому необходимо определить входные параметры процесса экстракции, позволяющие минимизировать время и температуру экстракции, использование органических растворителей в связи с их высокой стоимостью, а также обеспечивающие высокий выход и чистоту полимера с сохранением его структуры. Важными факторами, оказывающими влияние на выход полимера, являются температура и время спиртовой экстракции ПГА из биомассы [3].

Цель работы – определение оптимальных факторов экстракции для увеличения выхода полимера.

Материалы и методы. Исходный образец представляет собой лиофильно высушенную биомассу бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 с влажностью $3 \pm 0,2$ %.

В ходе эксперимента экстракцию биомассы проводили в два этапа. На первом этапе в качестве экстрагента использовали этанол [2]. Использование этилового спирта позволяет с одной стороны частично разрушить структуру клеточной мембраны и улучшить ее проницаемость, а с другой стороны – удалить липидоподобные соединения для получения полимера высокой чистоты. На втором этапе очищенную биомассу экстрагировали дихлорметаном. Выбор данного растворителя обусловлен его высокой растворяющей способностью по отношению к ПГА.

Эксперимент проводили с вариацией двух факторов экстракции этанолом: температуры и времени. Исследование было поставлено в виде полного двухфакторного эксперимента с тремя уровнями вариации каждого фактора. На основе предварительных результатов [2] экспериментальный диапазон отобранных переменных процесса представлен в табл.1.

Таблица 1 – Входные параметры и их уровни, используемые в факторном анализе

Входной параметр	Переменная	Уровень фактора		
		0	1	2
Температура экстракции, °C	X ₁	30	45	60
Время экстракции, мин	X ₂	30	60	90

Результаты. Полученные результаты двухфакторного эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Выход ПГА в зависимости от вариации времени и температуры экстракции

Номер эксперимента	Исучаемые факторы		Результат опыта Выход ПГА, % (Y)
	Температура °C (X ₁)	Время экстракции, мин (X ₂)	
1	30	30	62 ± 2
2	30	60	83 ± 3
3	30	90	80 ± 3
4	45	30	75 ± 2
5	45	60	81 ± 3
6	45	90	78 ± 2
7	60	30	68 ± 2
8	60	60	75 ± 3
9	60	90	53 ± 2

Результаты эксперимента проанализированы с помощью программы Excel 2010 с использованием регрессионного анализа данных. Получено уравнение линейной регрессии второго порядка (формула 1) для данного двухфакторного эксперимента:

$$Y = 79,96 - 0,23 * x_1 + 2,23 * x_2 \quad (1)$$

Значения коэффициентов регрессии были рассчитаны по данным выборки. Необходимо убедиться, что рассчитанные коэффициенты будут статистически значимы (т.е. отличны от нуля для значительной части выборок из рассматриваемой генеральной совокупности) и войдут в модель. Для оценки статистической значимости коэффициента регрессии выдвигается нулевая гипотеза о равенстве коэффициентов регрессии нулю. Р-значение – вероятность выполнения нулевой гипотезы для соответствующего коэффициента. Для наших данных $P(-0,23) = 0,3 \%$; $P(2,23) = 0,8 \%$. В связи с тем, что Р-значение менее 5 %, то коэффициенты статистически значимы с надежностью 95 %, и включаются в модель.

По коэффициентам уравнения видно, что фактор времени (x₂) дает более сильный отклик функции, чем фактор температуры (x₁), так как 2,23 > 0,23. Процесс извлечения экстрактивных веществ является диффузионным процессом. С повышением температуры, согласно кинетической теории, повышается скорость движения частиц растворенного вещества и уменьшается вязкость растворителя, что способствует увеличению скорости внутренней диффузии.

Выход полимера из биомассы, полученный в ходе эксперимента в зависимости от изменения температуры при различном времени экстракции, представлен на рисунке.

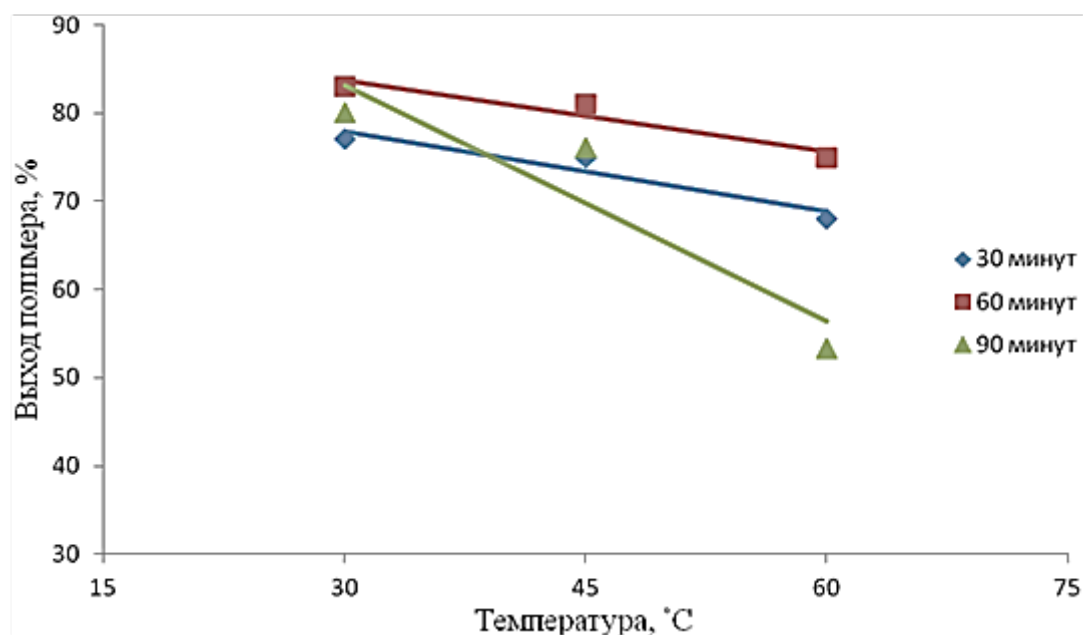


Рисунок – Влияние температуры спиртовой экстракции на выход ПГА в течение 30, 60 и 90 мин

Из графиков видно, что максимальный выход ПГА из биомассы (в процентном соотношении от содержания полимера в клетке) составил 83 ± 3 % при температуре 30 °C и времени воздействия этанолом 60 мин. Наименьший выход полимера (53 ± 2 %) получен при наиболее длительном времени обработки биомассы (90 мин) в максимальном температурном режиме (60 °C). Возможно, причиной снижения выхода полимера является денатурация белков, углеводов и других соединений под влиянием высоких температур, образование свободных активных радикалов, в том числе при окислении кислородом, что приводит к разрыву более слабых связей в молекуле полимера [4,5]. Таким образом, при воздействии температуры экстракции свыше 45 °C выход полимера снижается, аналогичное негативное воздействие оказывает и продолжительность экстракции в условиях повышенных температур. С увеличением времени экспозиции, степень деструкции полимера возрастает, а количественные характеристики снижаются. Так, при самой минимальной температуре экстракции (30 °C) средневесовая молекулярная масса полимера составляет около 708,54 кДа, а при воздействии более высоких температур (60 °C) она уменьшается до 501,88 кДа. В это же время при увеличении температуры отмечается снижение выхода полимера на 36 %.

Заключение. По результатам проведенного эксперимента можно отметить, что максимальный выход ПГБ из биомассы составил 83 ± 3 % при температуре 30 °C и времени экспозиции 60 минут. Полученные результаты свидетельствуют, что процесс экстракции ПГБ требует мягкого режима обработки биомассы этанолом, и в дальнейшем, решение оптимизации процесса экстракции будет сведено к нахождению входных технологических параметров, позволяющих получать полимер с требуемым выходом, характеристиками и с заданной чистотой.

Литература

1. Киселев Е.Г. Сравнительное исследование методов экстракции ПГА из биомассы бактерий / Е.Г. Киселев, А.В. Демиденко // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Т. 7, №2. – 2014. – С. 148-160.
2. Salmiati. Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification / Salmiati, Z. Ujang, M.R. Salim, G. Olsson // Proceedings of

the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE Conference and Exhibition. – 2009.– P. 28-35.

3. Roy Ipsita. Polyhydroxyalkanoate (Pha) Based Blends, Composites and Nanocomposites/ Roy Ipsita, Visakh P. M. // Royal Society of Chemistry. – 2014 . – P.450.

4. Prasad M.P. Production and isolation of polyhydroxyalkanoates from *Pseudomonas sp.* using waste cooking oil as a sole carbon source / Prasad M.P. and Rekha Sethi //International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – Vol 4. – Issue 4. – 2013. – P. 527-532.

5. Mitra Mohammadi. Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol / Mitra Mohammadi, Mohd Ali Hassan, Lai-Yee Phang, Hidayah Ariffin, Yoshihito Shirai, Yoshito Ando // BiotechnolLett. – 2012. – P. 253–259.

КРИСТАЛЛИЧНОСТЬ И РАЗРУШАЕМОСТЬ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ РАЗЛИЧНОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

Н.О. Жила^{1,2}, О.Н. Меньшикова², Д.А. Сырвачева²

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

²Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Академгородок, Красноярск, 660036, Россия

E-mail: nzhila@mail.ru

Способность полигидроксиалканоатов разрушаться в биологических средах является одним из наиболее ценных их свойств. Полигидроксиалканоаты и изделия из них разрушаются в биологических средах с образованием безвредных для окружающей среды продуктов: диоксида углерода и воды в аэробных условиях и метана и воды – в анаэробных. Биodeградация ПГА осуществляется специализированными ПГА-деградирующими микроорганизмами, обладающими внутри- или внеклеточными ПГА-деполимеразами. Работ по сравнительному исследованию особенностей разрушения ПГА различного химического состава, в том числе по особенностям разрушения особо перспективных сополимеров поли(3-гидроксibuтират/4-гидроксibuтират) (П(3ГБ/4ГБ)) и поли(3-гидроксibuтират/3-гидроксигексаноат), обладающих пониженной степенью кристалличности и свойствами эластомеров, немного, и опубликованы они сравнительно недавно.

Цель работы – сравнительное исследование закономерностей деструкции четырех типов полигидроксиалканоатов: гомополимера поли(3-гидроксibuтирата) (П(3ГБ)) и сополимеров 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом (3ГВ), 3-гидроксигексаноатом и 4-гидроксibuтиратом.

Материалы и методы. Все типы полигидроксиалканоатов синтезированы в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН с использованием водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646. В качестве основного углеродного субстрата использовали фруктозу. Соплимеры получали добавлением солей валериановой и гексановой кислот или γ -бутиролактона. Синтезированные сополимеры содержали 10-12 мол.% 3ГВ, 3ГГ или 4ГБ. Сравнительное исследование микробиологического разрушения ПГА выполнено в лабораторных условиях в почвенных микрoэcosystemах при постоянной температуре $21^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ и влажности почвы – 50 %. Время экспозиции в почве составляло 35 суток. Показателями биodeградации ПГА служили убыль массы образцов, изменение молекулярно-массовых характеристик, степени кристалличности; морфология и свойства поверхности.

Результаты. Исследование динамики убыли массы образцов полигидроксиалканоатов показало, что наиболее быстро разрушающимся полимером был П(ЗГБ/4ГБ), который полностью разрушился за 35 суток. Остаточная масса других сополимеров на 35 сутки эксперимента составляла 7-10% от исходной. Наименее разрушающимся полимером оказался П(ЗГБ) – на 35 сутки эксперимента разрушилось лишь около 60% полимера.

Показано, что для всех сополимерных образцов характерно увеличение степени кристалличности как показателя преимущественного разрушения аморфной фазы. Степень кристалличности наименее разрушенных образцов П(ЗГБ) через 35 суток экспозиции в почве практически не изменилась. Это позволяет говорить о том, что в процессе разрушения этого типа ПГА обе фазы (кристаллическая и аморфная) разрушались равномерно. Степень кристалличности образцов сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) и П(ЗГБ/ЗГГ) от исходных 60 и 56% возрастала, до 64 и 60% соответственно, то есть в данном случае более активно разрушалась аморфная фаза. Еще более выражен этот эффект для сополимеров П(ЗГБ/4ГБ), степень кристалличности которых от исходной (50%) возросла до 63%.

Самое высокое значение средневесовой молекулярной массы (M_v) у П(ЗГБ/ЗГВ) – 1120 кДа; у П(ЗГБ) и П(ЗГБ/4ГБ) были близкие значения 625 и 597 кДа – ниже практически в 2 раза относительно П(ЗГБ/ЗГВ); у П(ЗГБ/ЗГГ) самое низкое – 356 кДа. Полидисперсность исследуемых образцов также варьировала от 2,43 до 3,92 в зависимости от состава. Величина M_v медленно разрушаемого гомополимера П(ЗГБ), а также сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) и П(ЗГБ/ЗГГ) практически не изменялась, несмотря на значительную убыль массы. Однако у наиболее активно разрушаемого сополимера П(ЗГБ/4ГБ) уже через 7 суток отмечено резкое снижение значений молекулярной массы и возрастание полидисперсности. За первую неделю среднечисловая и средневесовая молекулярные массы снизились в 4,5 и 1,88 раз соответственно, а полидисперсность возросла в 2,2 раза. К концу эксперимента эти значения составили 33 и 317 кДа.

Исследование поверхности пленок из полигидроксиалканоатов показало, что по мере их разрушения на поверхности формировались увеличивающиеся во времени перфорации и трещины. Последующее распространение дефектов внутрь образцов сопровождалось дефрагментацией; выраженность этого процесса соответствовала активности разрушения.

Заключение. Впервые исследована деградация четырех типов ПГА различного химического строения, которые по скорости разрушения расположены в ряду: П(ЗГБ/4ГБ) > П(ЗГБ/ЗГГ) > П(ЗГБ/ЗГВ) > П(ЗГБ).

НАКОПЛЕНИЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В КЛЕТКАХ РОДОКОККОВ В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ И ПРИ НЕДОСТАТКЕ КИСЛОРОДА В СРЕДЕ

Е. Ю. Бурлуцкая¹, Ю. Г. Максимова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
г. Пермь, Россия

²ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, г. Пермь, Россия
E-mail: burlutskajalena@yandex.ru

Полигидроксиалканоаты (ПГА) — полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, синтезируемые микроорганизмами в качестве запасных питательных веществ в условиях недостатка основных питательных элементов – источников азота, фосфора, серы,

магния, а также недостатка кислорода, и при избытке предшественников полимеров – соединений углерода [1].

Согласно данным, имеющимся в научной литературе, известно, что для большинства охарактеризованных к настоящему времени продуцентов ПГА значительное накопление полимера имеет место при несбалансированном росте – дефиците в среде биогенных элементов (азота и фосфатов), для некоторых – при дефиците кислорода [2, 3]. Таким образом, вопрос о влиянии уровня содержания азота и фосфатов в среде культивирования бактерий является довольно актуальным, в частности, для изучаемого нами штамма *R. ruber* П5-8.

Целью настоящей работы явилось изучение накопления ПГА в клетках родококков при двустадийном росте, лимитированном по азоту или фосфору в аэробных и микроаэробных условиях.

Материалы и методы. Штамм *Rhodococcus ruber* П5-8, выделенный из почвы Пермского края [4], культивировали последовательно на синтетической минеральной среде 1 и среде 2. Среда 1 служила для накопления биомассы и была сбалансирована по источникам углерода, азота и фосфора. Среда 2 служила для синтеза ПГА и была дефицитной по азоту или фосфору. Источником углерода являлся бутират натрия. Микроаэробные условия для культивирования на среде 2 создавали насаиванием стерильного вазелинового масла на поверхность жидкой среды. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл в 50 мл среды 1 в течение 5 дней, затем переносили в 10 мл среды 2. Культивировали в тех же условиях еще 5 дней, центрифугировали, высушивали биомассу до постоянного веса и определяли общее содержание ПГА методом масс-спектрометрии на аппарате 689/573T MSD (Agilent-Hewlett Packard) после метанолиза образцов при 100°C и экстракции хлороформом.

Результаты. В ходе эксперимента наибольшее накопление ПГА наблюдали на аэробной среде, лимитированной по источнику элементов – азота и фосфора. Максимальное накопление полимера было выявлено в аэробных условиях с недостатком фосфора. Клетки родококков, в фазе накопления ПГА испытывающие недостаток кислорода, не накапливали значительного количества полимера (таблица).

Таблица – Продукционные показатели штамма *Rhodococcus ruber* П5-8

	1	2	3	4	5	6	7
Масса ПГА (мкг/мг сухих клеток, среднее)	63	423	140	518	48	0	28
Урожай (мг/мл, среднее)	1,24	4,99	4,47	4,0	1,85	4,4	5,18

Примечание: 1 – аэробная полноценная минеральная среда, рост 10 суток; 2 – аэробная полноценная минеральная среда, рост 5 суток; 3 – аэробная среда, ограниченная по источнику азота, рост 10 суток; 4 – аэробная среда, ограниченная по источнику фосфора, рост 10 суток; 5 – микроаэробная полноценная среда, рост 10 суток; 6 – микроаэробная среда, ограниченная по источнику азота, рост 10 суток; 7 – микроаэробная среда, ограниченная по источнику фосфора (10 суток).

Таким образом, доступность кислорода и недостаток питательных элементов – азота и фосфора благоприятно сказывается на накоплении ПГА у штамма *R. ruber* П5-8. Кроме того, сокращение длительности культивирования до пяти дней даже на полноценной минеральной среде с бутиратом натрия как источником углерода приводит к эффективному накоплению полимера.

Работа поддержана Комплексной программой Уральского отделения РАН (0426-2015-0028), проект № 15-4-4-26 «Биосинтез и биокаталитическая трансформация полимерных соединений».

Литература

1. Бессонова В.А., Сапего Д.В. Общие свойства и биотехнологическое использование бактериальных ПГА // Современные научные исследования и инновации. 2017. № 1 № 1 [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2017/01/77471> (дата обращения: 02.06.2017).
2. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск, 2011. 392 с.
3. Калачева Г. С., Синтез полиэфиров гидроксипроизводных жирных кислот (полигидроксиалканоатов) и характеристика состава липидов сине-зеленых, светящихся и водородокисляющих прокариот // Автореферат на соискание степени канд. биол. наук. – Красноярск, ФГБУН ИБФ СО РАН, 2012. – 72 с.
4. Осипова И.А., Ремезовская Н.Б., Максимов А.Ю. Биотрансформации, катализируемые эстеразами в гетерогенных системах // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18), № 2(1). С. 744–746.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕЦЕПТУРЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ РОСТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ

А.Н. Сизенцов, А.М. Короткова, В.Ф. Володченко

Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, пр. Победы, 13, корп. 16, Россия
E-mail: anastasiaporv@mail.ru

Известно, что казеин содержит все незаменимые аминокислоты и является важным пищевым компонентом. В работе использовали данный белок в качестве источника необходимых аминокислот для развития штаммов *Escherichia coli* M-17, *Bacillus subtilis* 534, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, которые не синтезируются микроорганизмами экзогенно. Использовали казеин в расчете 1:10 (10 г казеина в 100 мл стерильной дистиллированной воды). В качестве источника органического углерода и энергии для пробиотических штаммов принята глюкоза. Для определения ее оптимальной концентрации для штамма использовали в различной концентрации (10–30 мл).

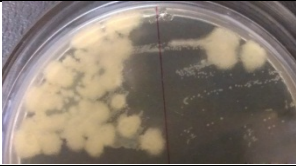
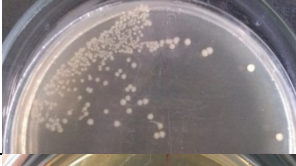
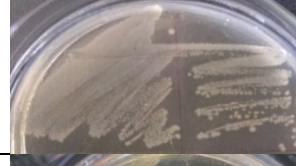
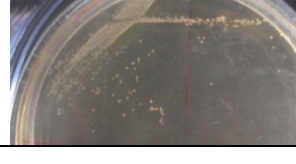
На этой основе приготовлена и исследована синтетическая питательная среда, состоящая из казеина, раствора глюкозы и комплекса солей. Для этого предварительно к 100 мл стерильной дистиллированной воды добавляли 10 г казеина, затем осуществляли стерилизацию ультразвуком и пастеризацией при 60 °С в течение 30–40 минут (табл. 1).

Таблица 1 – Рецепт рецептуры синтетической питательной среды (из расчета на 100 мл дистиллированной воды)

Компоненты	Количество вещества
Казеин	10 г
Глюкоза	20 мл
KH_2PO_4	85,94 мг/мл
CaCl_2	212,5 мг/л
NaCl	725 мг/мл
MgSO_4	1357,5 мг/мл

Среда испытана на серии штаммов. Для этого штаммы инкубировали в термостате при 37 °С, далее производили высев на стерильный питательный агар (*B. subtilis* 534, *E. faecium*, *E. coli* M-17) и на среду MRS (*L. acidophilus*). Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Определение интенсивности роста исследуемых микроорганизмов на различных питательных средах

Пробиотические штаммы	Условия культивирования		
	Контроль роста на питательной среде	Казеин и раствор 5% глюкозы	Казеин и раствор 5% глюкозы+ комплекс солей
<i>B. Subtilis</i> 534			
<i>E. faecium</i>			
<i>E. coli</i> M-17			
<i>L. acidophilus</i>			

Установлено, что синтетическая питательная среда, содержащая казеин 10 г, глюкоза 20 мл, CaCl₂ 212,5 мг/л, NaCl 725 мг/мл, KН₂РO₄ 85,94 мг/мл, MgSO₄ 1357,5 мг/мл из расчета на 100 мл воды, поддерживает рост пробиотических штаммов микроорганизмов.

Работа поддержана государственным заданием на проведение научно-исследовательских работ (проект № 342).

МЕЛАССА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК УГЛЕРОДА ДЛЯ СИНТЕЗА БИОМАССЫ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

Я.Д. Жондарева

ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г.

Севастополь, проспект Нахимова, 2, Российская Федерация

E-mail: yana.zhondareva@yandex.ru

Ростовые и продукционные характеристики микроводорослей в значительной мере определяются условиями углеродного питания, в том числе типом источника углерода. Многие микроводоросли способны осуществлять гетеротрофный, фотогетеротрофный или миксотрофный типы питания и использовать различные углеродсодержащие соединения. Такие организмы получают адаптивное преимущество, так как способны к оптимальному

выбору способа питания в зависимости от условий среды. Изучение влияния органических веществ на рост микроводорослей в естественных условиях осложняется невозможностью контроля за изменениями окружающей среды, поэтому анализировать скорости их роста возможно только при использовании лабораторных культур водорослей в качестве модельных объектов.

Действие органических веществ на рост микроводорослей зависит не только от их концентрации в среде, но и от химической природы этих соединений. Так, при добавлении в среду глицерина в концентрации не более 100 моль как источника углерода повышается скорость роста *Phaeodactylum tricornutum*, и увеличивается плотность культуры практически в 2 раза [1, 2], а наличие в среде глюкозы несколько замедляет рост культуры *P. tricornutum* [2].

Таким образом, органические вещества, применяемые при миксотрофном питании микроводорослей, должны быть не только недорогими и простыми для стерилизации, но и обеспечивать продуктивный рост и синтез биопродуктов. В мире существует множество крупных производителей сахара и, соответственно, побочной продукции, например, мелассы, содержащей более 50 % углеводов. Поэтому меласса широко применяется для выращивания микроорганизмов, в том числе в промышленных производствах.

Цель работы – исследование ростовых характеристик *Phaeodactylum tricornutum* при накопительном культивировании в условиях непрерывного освещения с использованием мелассы в качестве органического источника углерода. *P. tricornutum* – одноклеточная диатомовая микроводоросль, являющаяся перспективным объектом альгобиотехнологии как источник полиненасыщенных жирных кислот и используется как модельный объект для изучения физиологических реакций водорослей на присутствие в среде доступных органических соединений.

Материалы и методы. Исследование проводили с альгологически чистой культурой морской микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, полученной из коллекции Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН (г. Севастополь).

P. tricornutum культивировали на питательной среде Тренкеншу, содержащей природную морскую воду соленостью 18 ‰, которая предварительно пастеризовалась в течение 3 суток. Водоросль выращивали на унифицированной лабораторной установке в культиваторах плоскопараллельного типа объемом 1 л с толщиной слоя культуры 2 см при непрерывном освещении люминесцентными лампами в течение 9 суток до стационарной стадии роста культуры [3]. Освещенность рабочей поверхности фотобиореакторов составляла 8 клк, средняя температура на протяжении всего эксперимента 20-21°C. Ежедневно определяли вес сырой и сухой биомассы объемно-весовым методом; для этого клетки культуры микроводоросли отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин.

Результаты. Микроводоросль культивировали в накопительном режиме до достижения стационарной фазы роста. Урожай культуры достиг 2,1 г/л (по весу сухого вещества) при продуктивности 0,48 г/л сухого вещества в сутки. Остановка дальнейшего роста культуры объясняется наступлением углеродного компенсационного пункта фотосинтеза. Затем на 10 и 17-ые сутки в культуральную среду внесли мелассу (Сорг) (по 5 г). Это привело к увеличению концентрации клеток в культуре в 2 и 1,5 раза соответственно. Урожай биомассы водоросли составил на 35-е сутки культивирования 5,1 г/л (рисунок).

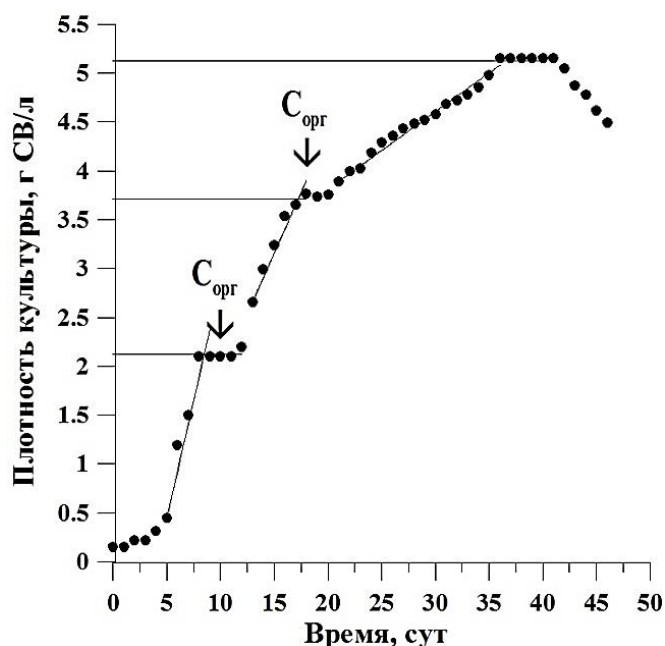


Рисунок – Динамика плотности накопительной культуры *Phaeodactylum tricornutum*

После добавления в среду органического углерода отмечен длительный переходный период перед возобновлением роста, продолжительность которого составляла около 4 суток [4]. Это время расходуется на синтез в клетке «белков-переносчиков» и на формирование транспортных симпорт-систем для поглощения клеткой органического углерода [5].

Таким образом, содержание углерода в культуре микроводорослей является одним из важнейших факторов, определяющих накопление максимальной плотности культуры. Результаты работы подчеркивают возможность использования мелассы в качестве перспективного источника углерода при накопительном культивировании *Phaeodactylum tricornutum*.

Литература

1. García M.C., Camacho F.G, Miron A.S., Sevilla J.M.F., Chisti Y., Grima E.M.. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. // J. Microbiol. Biotechnol. 2006. 16(5). pp. 689-694.
2. Жондарева Я.Д. Миксотрофный рост *Phaeodactylum tricornutum* на неорганической среде с глюкозой и глицерином в накопительной культуре / Морские биологические исследования: достижения и перспективы: в 3-х т.: сб. материалов // Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 3. С. 378–382.
3. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1097>.
4. Тренкеншу Р.П., Жондарева Я.Д. Лаг-период культуры *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin при переходе на гетеротрофный тип питания // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1141>.
5. Тренкеншу Р.П., Жондарева Я.Д. Кинетика симпорта органических форм биогенов у микроводорослей / Морские биологические исследования: достижения и перспективы: в 3-х т.: сб. материалов // Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 3. С. 452–455.

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ БАКТЕРИЙ *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B-10646, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКАХ УГЛЕРОДА

В.С. Безбидо

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

E-mail: vbezbido@mail.ru

Полигидроксикалканаты (ПГА) – это линейные полиэфиры, синтезируемые прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста. Совокупность свойств, характерных для ПГА, делает их перспективными для применения в различных сферах – медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и т.д. Жирные кислоты бактерий являются составляющими компонентами клеточных мембран, которые контактируют и реагируют на все изменения в окружающей среде, поддерживая взаимосвязь между структурой и функцией мембраны, сохраняя оптимальную степень текучести липидных компонентов. Изменения в мембранных липидах могут индуцироваться органическими загрязнителями или природой ростового субстрата.

Цель работы – изучение влияния источников углеродного питания на рост, синтез полимера и жирнокислотный состав внутриклеточных липидов водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646.

Материалы и методы. Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0.5 л, заполненных культурой на 50% объема с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при температуре 30 °C и 200 rpm. Для выращивания бактерий за основу была принята среда Шлегеля. Состав жирных кислот липидов в бактериальных клетках исследовалась при помощи рекомендации Soltani. Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометре GCD plus («Hewlett Packard», USA).

Результаты. Урожай биомассы и содержание полимера в клетках бактерий, выращиваемых на исследуемых субстратах, было сопоставимым и составляло соответственно 6.7-7.1 г/л и 75-79% от веса сухой биомассы (рисунок).

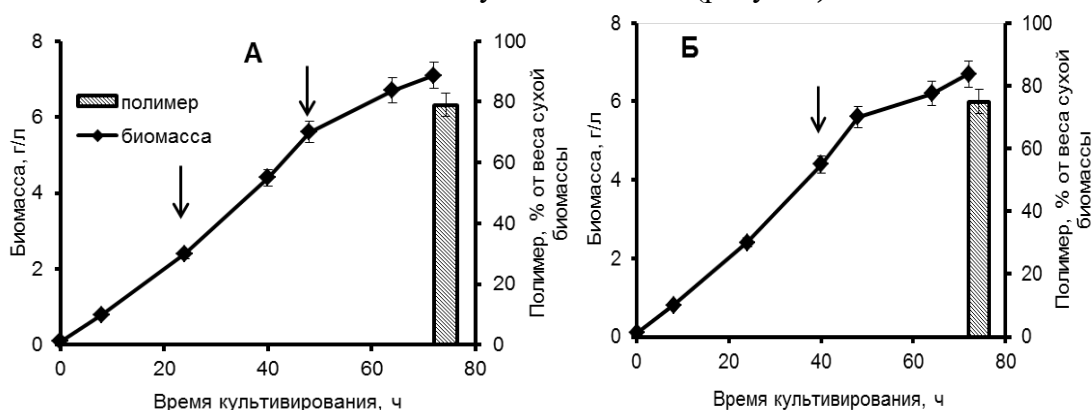


Рисунок – Динамика накопления биомассы и содержание полимера в конце культивирования у *Cupriavidus eutrophus* B10646 при росте на фруктозе (А) и олеиновой кислоте (Б). стрелками показано добавление субстрата

Анализ жирнокислотного состава внутриклеточных липидов показал, что при росте бактерий на фруктозе основной насыщенной кислотой была пальмитиновая (16:0). Доля

миристиновой (14:0) и стеариновой кислот (18:0) составляла 1.0-1.2%. Остальные насыщенные кислоты (10:0, 12:0, 15:0, 17:0) отнесены к минорным компонентам, Доминирующими моноеновыми кислотами были пальмитолеиновая (16:1 ω 7) и цисвакценовая (18:1 ω 7). Остальные моноеновые кислоты (14:1 ω 5, 15:1 ω 6, 16:1 ω 5, 17:1 ω 9, 18:1 ω 9) являлись минорными компонентами. Относительное содержание циклопропановых кислот составляло 23%. Соотношение насыщенных кислот к ненасыщенным составляло 2.4. Замена углеводного субстрата на олеиновую кислоту отразилась на спектре ЖК внутриклеточных липидов бактерий. Доля минорного изомера 18:1 ω 9 (олеиновая кислота) возросла с 0.2 до 30.6%. При выращивании бактерий на этих субстратах содержание циклопропановых кислот составляло всего лишь 8% от суммы жирных кислот. Соотношение насыщенных к ненасыщенным кислотам составляло 0.9.

ВЛИЯНИЕ ТИПА УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА НА МОЛЕКУЛЯРНУЮ МАССУ ПОЛИМЕРА, СИНТЕЗИРУЕМОГО *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS*

B-10646

М. Д. Косенок

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

E-mail: margaritadi@mail.ru

Молекулярная масса ПГА – это один из важных показателей, так как она влияет на физико-механические характеристики полимера, от чего в свою очередь зависит возможность переработки полимера в различные изделия.

Цель работы: исследовать влияние типа углеродного субстрата на синтез и молекулярную массу полимера, синтезируемого *Cupriavidus eutrophus* B-10646.

Материалы и методы. Бактерии выращивали в стеклянных колбах при температуре 30°C. Для выращивания бактерий за основу была принята среда Шлегеля. В качестве углеродных субстратов использовали фруктозу, глюкозу и олеиновую кислоту. Внутриклеточную концентрацию полимера определяли на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“Hewlett Packard”, USA). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гелъпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия).

Результаты. Урожай биомассы и содержание полимера в клетках бактерий, выращиваемых на исследуемых субстратах, был сопоставимым и составлял соответственно 6.7-7.1 г/л и 75-80% от веса сухой биомассы (рис. 1).

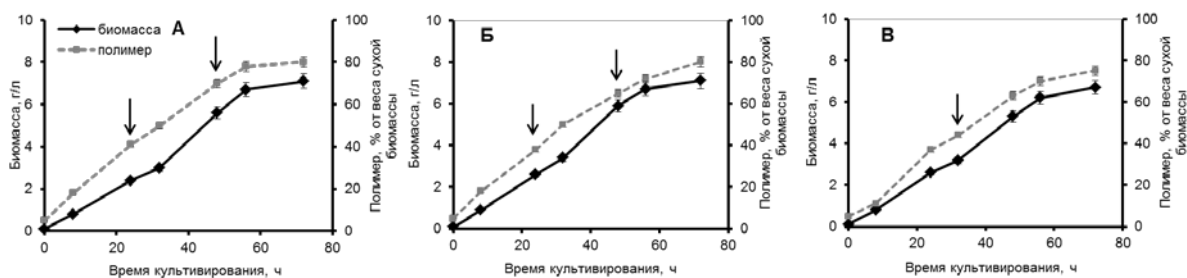


Рисунок 1 – Динамика накопления биомассы и полимера у *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при выращивании на фруктозе (А), глюкозе (Б) и олеиновой кислоте (В). Стрелками показано время добавления субстрата

Помимо общего выхода, исследованы состав и молекулярно-массовые характеристики полимера, синтезируемого бактериями *C. eutrophus* B-10646 в ходе роста культуры (рис. 2).

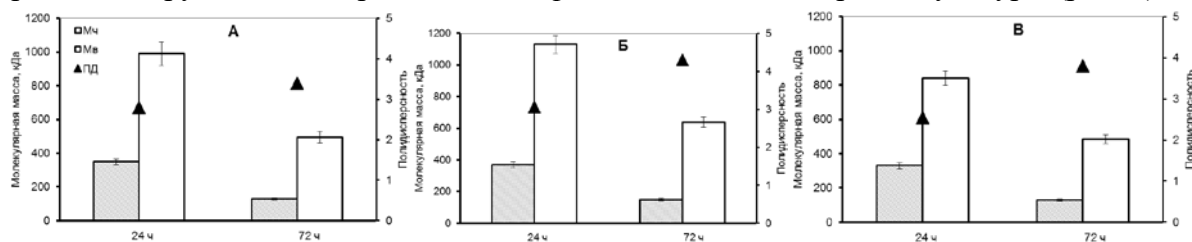


Рисунок 2 – Показатели среднечисловой, средневесовой молекулярной массы и полидисперсности полимера на 24 и 72 ч культивирования на фруктозе (А), глюкозе (Б) и олеиновой кислоте (В)

Образцы полимера, отобранные из проб клеточной биомассы на 24 часа культивирования, имели значение средневесовой молекулярной массы (M_w) 840-1130. Установлено, что молекулярная масса полимера, как среднечисловая, так и средневесовая к концу культивирования снижалась, а полидисперсность, наоборот, возрастала. Показано отсутствие влияния типа используемого субстрата на показатели молекулярной массы. На 72 ч культивирования на всех субстратах средневесовая и среднечисловая молекулярные массы составляли, соответственно, 540-600 и 130-150 кДа.

FATTY ACID COMPOSITION AND POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION BY *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B-10646 CELLS UNDER AUTOTROPHIC AND HETEROTROPHIC GROWTH CONDITIONS

N.O. Zhila^{1,2}, G.S. Kalacheva¹

¹Institute of Biophysics SB RAS, Akademgorodok 50, 660036, Krasnoyarsk, Russian Federation

²Siberian Federal University, 79 Svobodny pr., 660041, Krasnoyarsk, Russian Federation

E-mail: nzhila@mail.ru

For a number of bacteria, metabolism of lipids and fatty acids (FAs) is closely related to the synthesis of reserve lipid macromolecules, particularly polymers of hydroxy FAs (polyhydroxyalkanoates, PHA), which are made up of such monomers as intermediate metabolites of synthesis of FA β -oxidation. PHA synthesis in bacterial cells of this species is closely related to lipid metabolism, especially if the cells are grown on such substrates as long-chain-length FAs or vegetable oils. *Cupriavidus* is among the best studied PHA producers. The data on the composition of lipids and their FAs in *Cupriavidus* strains were reported in a few studies. Changes in membrane lipids were found to be induced by organic impurities in *R. eutropha* H850 cells and by the type of the growth substrate in *Cupriavidus necator* JMP134.

The purpose of this study was to investigate the composition of lipid fatty acids of the cytoplasmic membrane and cell wall in *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown in batch culture on various carbon substrates in the phases of cell growth and intracellular PHA accumulation.

Materials and Methods. The strain used in this study was *Cupriavidus eutrophus* B-10646, registered in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms Cells were grown in batch culture on Schlegel's mineral medium. Under autotrophic conditions, the growth substrate was the gas mixture of $\text{CO}_2:\text{O}_2:\text{H}_2=1:2:7$ by volume. In heterotrophic culture, cells were grown on various substrates: fructose, glucose, oleic acid, sunflower seed oil, and glycerol. Intracellular PHA content and composition of extracted polymer samples were analyzed with a GC-MS (7890/5975C,

Agilent Technologies, U.S.). The lipids were extracted from wet biomass according to the Folch procedure with the chloroform–methanol mixture (2:1 v/v). FAMES were analyzed on a GC-MS 7890/5975C (Agilent Technologies, U.S.).

Results. The highest cell concentrations (10-11 g/L) and PHA yields (8.7-9.5 g/L) were obtained on sugars (fructose and glucose) and oleic acid. Under autotrophic growth conditions (CO₂:H₂:O₂) and with glycerol used as a growth substrate, these parameters were lower: 4.3-4.5 g/L and 2.2-3.0 g/L, respectively. In cells grown on sugars and in autotrophic culture, during the phase of active cell growth, the major fatty acids of the lipids of cytoplasmic membrane were palmitic, palmitoleic, and *cis*-vaccenic acids. In the stationary phase of cultivation, cyclopropane fatty acids were also detected. When carbohydrate substrate was replaced by oleic acid or sunflower seed oil, the proportion of oleic acid in the total fatty acids of the cytoplasmic membrane increased considerably. In addition to that, the lipid fatty acids of bacterial cells grown on sunflower seed oil also contained linoleic acid, which is the major acid of sunflower seed oil. The major acids of strongly bound lipids of cell wall (SBLs) were myristic acid and long-chain-length β -hydroxy acids.

Conclusion. Molecular weight of the polymer during its accumulation in cells was measured; for the first time, the presence of 2 polymer fractions (high-molecular weight and low-molecular-weight ones) was recorded in cells with a low polymer content.

Acknowledgments

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research, Government of Krasnoyarsk Territory, Krasnoyarsk Region Science and Technology Support Fund to the research project № 17-44-240775.

CHARACTERIZATION OF A NOVEL STRAIN OF ACETIC ACID BACTERIA KOMAGATAEIBACTER XYLINUS

S.V. Prudnikova, I.P. Shidlovsky

Siberian Federal University, 79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

E-mail: sprudnikova@sfu-kras.ru

Bacterial cellulose synthesized by acetic acid bacteria is a valuable product of biotechnology. BC displays many unique physicochemical and mechanical properties, including higher purity, higher crystallinity and degree of polymerization, higher water absorbing, tensile strength and stronger biological adaptability [1, 2]. The application area of BC is growing and now it includes biomedicine, food industry, cosmetology and other applications [3, 4].

Bacterial cellulose can be obtained using an association of microorganisms *Medusomyces gisevii* J. Lindau, known as fermented tea (Kombucha), or in a pure culture of bacteria belonging to the genus *Komagataeibacter*. Several types of BC producers differing in biochemical properties, productivity and substrate requirement are described in literature.

The purpose of this work is characterization of properties of a novel bacterial strain *Komagataeibacter xylinus* as a promising bacterial cellulose producer.

Materials and Methods. *K. xylinus* B-12068 was isolated from the fermented tea on standard Hestrin-Schramm (HS) medium. The strain shows typical generic features. The colonies on solid HS medium are small, convex, opaque, pale and non-pigmented. Bacterial cells are Gram-negative, rod shaped, non-motile, and single or pair, 0.4-0.6 × 1.0-1.5 μ m. The bacteria are strictly aerobic, positive in catalase and negative in oxidase tests, lack of proteolytic and amylolytic activity, require growth factors (yeast extract), sensitive to NaCl concentrations above 0.5 %. In the fatty acid composition palmitic, stearic and *cis*-vaccenic acids are dominant.

The identification of the strain showed its close genetic similarity with other species of this genus, such as *K. intermedius*, *K. europaeus*, *K. rhaeticus* and *K. oboediens*. For correct identification, our strain was differentiated from other species based on requirement of acetic acid for growth, growth on 3 % (v/v) ethanol in the presence 5-8 % acetic acid and growth in the presence of 30 % (w/v) D-glucose.

Results. The strain *K. xylinus* B-12068 displays resistance to low values of the initial pH of the medium. Enrichment of HS-medium with ethanol increased the yield of bacterial cellulose by 2-4 times as compared to standard medium under static and shaking conditions, respectively. The strain produced bacterial cellulose nanofibers with an average diameter of about 40 nm in the glucose-enriched media (Figure).

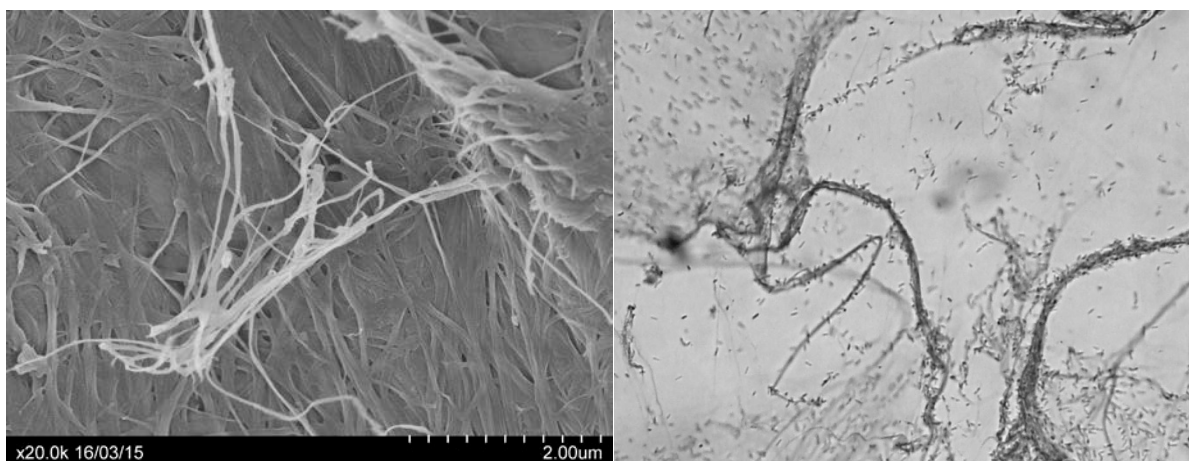


Figure – SEM and light microscopy photos of bacterial cellulose nanofibrils synthesized by *K. xylinus* B-12068

Conclusion. The ability of the strain to grow and produce cellulose on media with sucrose or glycerin has also been detected. In addition, the residue, after alcohol was distilled, was assimilated by the strain and was useful for bacterial cellulose producing. Thus, the isolated strain *K. xylinus* B-12068 is a promising producer for obtaining bacterial cellulose under different growth conditions.

References

1. Castro, C., Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. / C. Castro, R. Zuluaga, J.L. Putaux et al. // Carbohydrate Polymers, 2001. – 84(1). – p. 96-102.
2. Mohammadkazemi, F. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media / F. Mohammadkazemi, M. Azin, A. Ashori// Carbohydrate polymers, 2015. – 117. – p. 518-523.
3. Fu, L. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. / L. Fu, J. Zhang, G. Yang //Carbohydrate polymers, 2013. – 92(2). – p. 1432-1442.
4. Keshk, S. M. Bacterial cellulose production and its industrial applications/ S. M. Keshk //Journal of Bioprocessing & Biotechniques, 2014. – 4(2). – p. 1-10.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COMPOSITES OF BACTERIAL CELLULOSE KOMAGATAEIBACTERXYLINUS B-12068 WITH SILVER NANOPARTICLES

I.P. Shidlovskiy, A.A. Shumilova

Siberian Federal University, Svobodnuy av., 79, 660041, Krasnoyarsk, Russia
Institute of Biophysics SBRAS, Akademgorodok, 50/50, 660036, Krasnoyarsk, Russia
E-mail: shumilova.ann@mail.ru

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer, synthesized by microorganisms, similar in chemical structure to plant cellulose, but possessing unique physico-mechanical and chemical properties. BC is characterized by high biocompatibility, does not show cytotoxicity or allergic reactions. The BC demonstrates no adhesion towards opened soft tissues, so can it be an ideal material for the wound dressings and other medical devices, intended for the contact with inner medium of human body. Gel-films of BC have an ordered structure and represent a three-dimensional network structure, consisting of evenly distributed ribbon-like microfibrils. Complex of properties in a combination with cheapness and simplicity of the synthesis make BC is very popular for the investigations as a material for the restoration of skin, bones, connective tissues of different structure, blood vessels, even for the basis for drug deposition and delivery,

The purpose of this work is to obtain and to characterize bacterial cellulose composites with silver nanoparticles.

Results. Bacterial cellulose films were synthesized in culture *Komagataei bacterxylinus* B-12068 with the method of surface culturing in static conditions. To remove remnants of bacterial cells and components of grow medium BC films were treated with 1.0 M NaOH at 70 °C, with following streamed washing in deionized water. For BC composites with silver nanoparticles a hydrothermal method was used, without the utilization of any catalysts, using the discs of BC layer as a reducing and stabilizing agent. Two modes of hydrothermal preparation of the bacterial cellulose composite with silver nanoparticles [BC/AgNps] were used: a change in the temperature and AgNO₃ concentration in the reaction solution; this provided a series of samples (Fig. 1-2). It follows from the presented figure that the change in the temperature of the medium with the AgNO₃ concentration of 0.001 M had a different effect on the size of the silver nanoparticles formed. After incubation of BC films in a solution of silver nitrate at 30 °C, there appeared to be an aggregation of the silver particles formed and their average size was recorded at 757 nm. When the temperature of the reaction solution was increased to 60 and 90 °C, the particle size was significantly reduced, to 45 and 13 nm, respectively. The use of AgNO₃ solutions of different concentrations (0.0001, 0.001 and 0.01 M) with stabilization of the medium temperature at 90 °C provided the formation of silver nanoparticles with an average size of 13, 23 and 12 nm, respectively.

The presence of silver in the BC-films was confirmed with the scanning electron microscopy and X-ray spectra analysis (table 1, fig. 2). It was shown, that the average atomic number of silver particles in composite samples depended from the temperature in system insignificantly, and was 3.08, 3.32 and 3.87 at 30, 60 and 90 C, respectively. In contrast, increasing of concentration of AgNO₃ in the reaction solution from 0.001 to 0.01 M was accompanied by a increasing of silver content in the composites from 1.08 to 5.32.

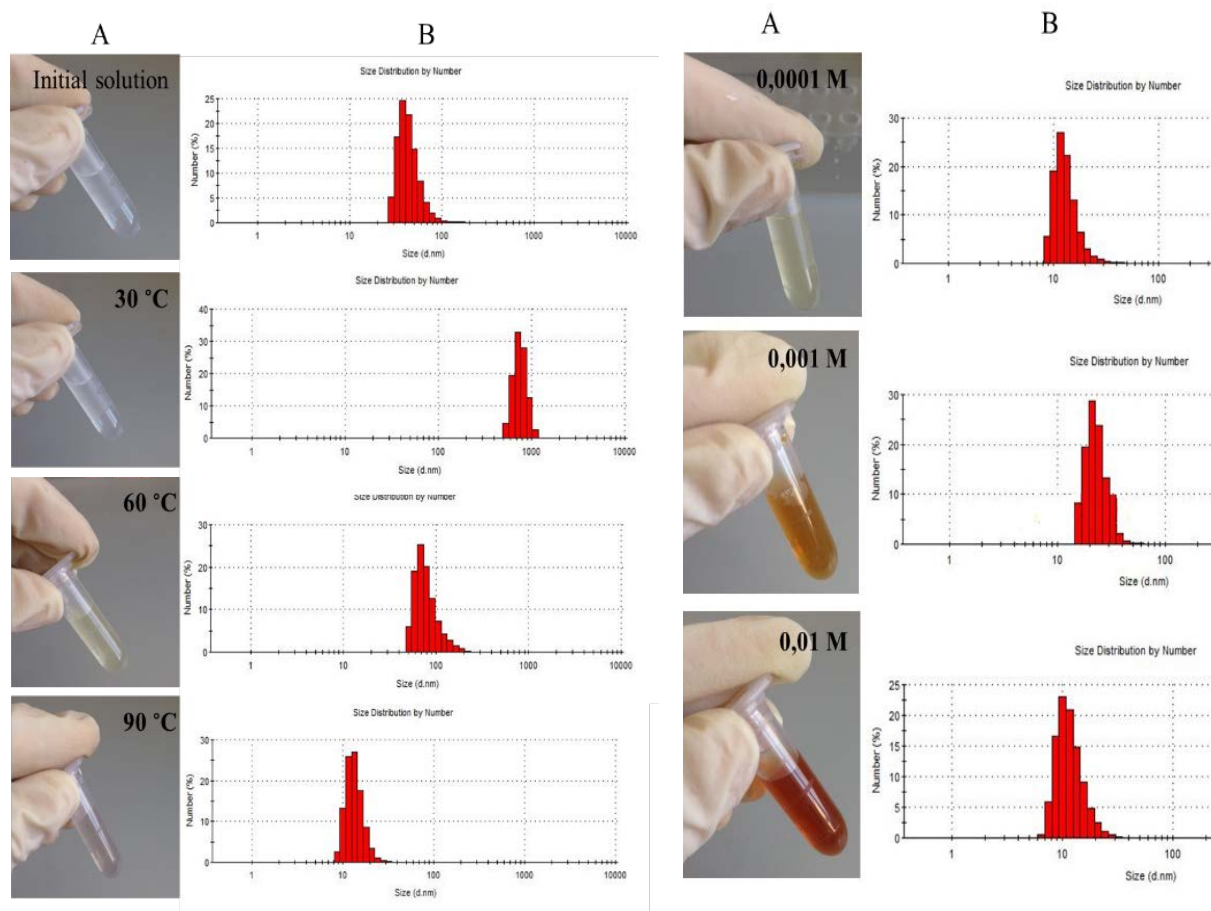


Figure 1 –An appearance (A) of the reaction medium and sizes characteristics of Ag-nanoparticles in the system (B) during the synthesis of composites films with different temperatures and AgNO₃-concentrations modes

Antibacterial effect of BC/AgNps composite in direct contact with the cultures observed was expressed in vary degrees for the different strains. In general, *E.coli* and *K.pneumoniae* were less sensitive, *P.Aeruginosa* and *St.aureus* – more sensitive. Also, marked differences were found towards the samples, obtained at 60 and 90 °C. The observed differences in diameters of growth suppression zones can be explained with the physiological characteristics of strains, that causes their different sensitivity with the direct contact with silver ions in BC/AgNps composites.

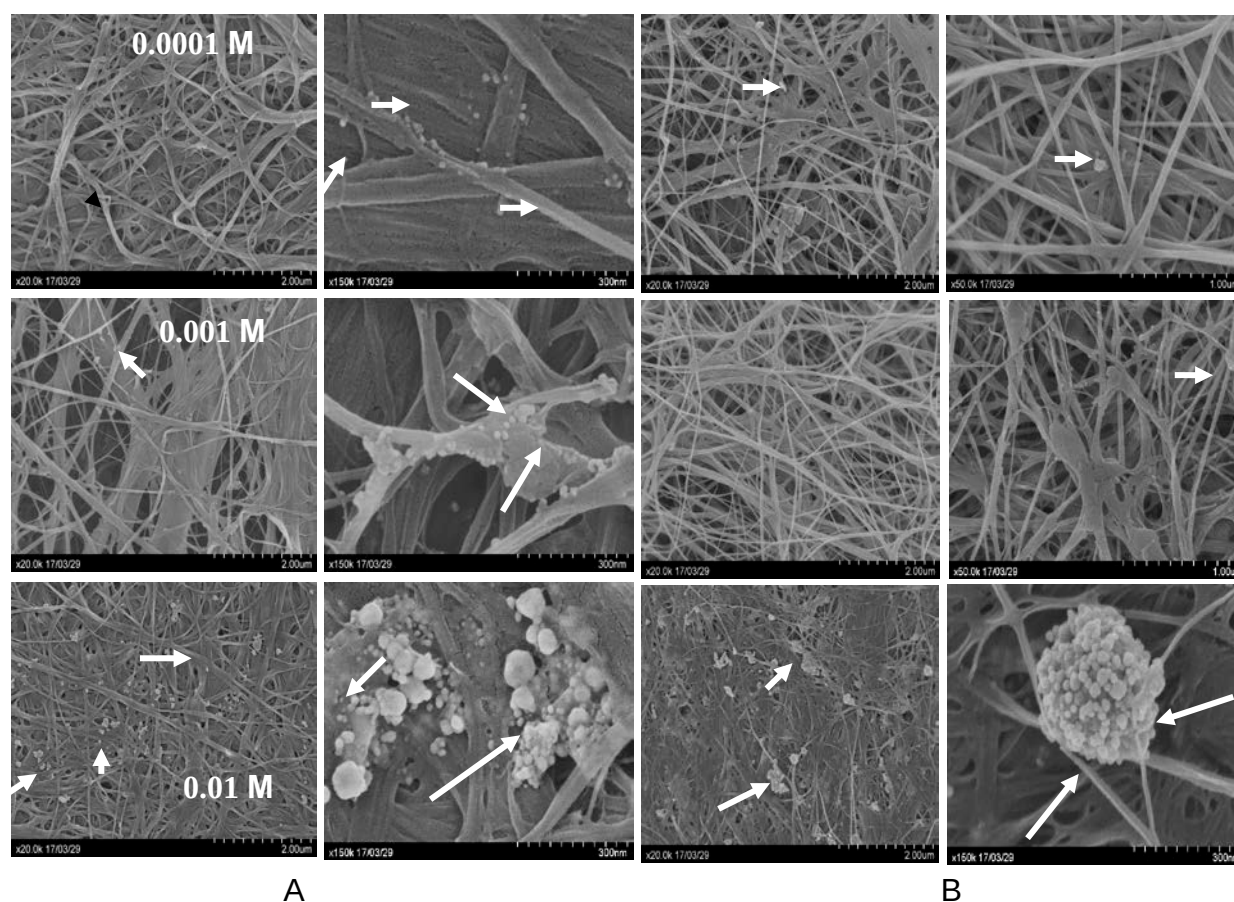


Figure 2 – SEM of BC composites films with silver nanoparticles BC/AgNps, during the synthesis with different temperatures (A) and AgNO₃-concentrations modes (B). Bar 200 and 300 μm

Table – The influence of conditions of system to the element composition of BC/AgNps

Samples	Average atomic number			
	O	C	N	Ag
BC film	59.8	40.1	-	-
Influence of temperature at 0.001 M:				
30 °C	52.9	42.5	1.10	3.08
60 °C	51.05	40.3	0.60	3.32
90 °C	52.3	41.7	1.5	3.71
Influence of AgNO ₃ concentration at 90 °C:				
0.0001 M	51.03	43.9	1.48	1.08
0.001 M	54.2	41.7	0.59	3.65
0.01 M	50.2	40.7	1.20	5.32

Conclusions. The different modes of synthesis of composite bacterial cellulose wound coverings with silver nanoparticles in tended for wounds, infected with Gram-negative and Gram-positive bacteria, were investigated. An inclusion of silver nanoparticles into the structure of bacterial cellulose layer with hydrothermal synthesis at 60 and 90 °C provides the formation of bio-active surface of BC/AgNps composite hydrogel films, having antibacterial influence to the wound pathogenic flora, more notice able for *E. coli* and *K.pneumoniae*.

Acknowledgments

The reported study was funded by RFBR and Government of Krasnoyarsk Territory according to the research project № 16-43-242024

ГИБРИДНЫЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ БИОСИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ МАТЕРИАЛОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ

И.П. Шидловский¹, А.А. Шумилова¹, Е.Д. Николаева²

¹*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50*

E-mail: ivan.shidlovskiy.314@mail.ru

Ключевая проблема для создания биотехнологических тканеинженерных эквивалентов кожи – поиск адекватных материалов, которые должны обладать спектром специальных свойств и придавать тканеинженерным конструкциям (графтам) характеристики, присущие живым тканям: 1) способность к самовосстановлению; 2) способность поддерживать кровоснабжение; 3) способность изменять строение и свойства в ответ на факторы окружающей среды, включая механическую нагрузку.

Проблемы, стоящие перед тканевой инженерией, заключаются в том, чтобы оптимизировать выделение, размножение и дифференцировку клеток, сконструировать каркасы (матрицы, носители) или системы доставки, способствующие поддержанию и координации роста трехмерных тканей вне организма. Матрицы (каркасы) должны выступать в качестве шаблона и индуктора для размножения и дифференцировки клеток в специализированные клетки, генерирующие новую ткань. Ткань может быть выращена на матриксах, которые после имплантации в организм хозяина постепенно, по мере роста новой ткани, полностью исчезнут (резорбируются). Возможно, также имплантировать «биокомпозит», состоящий из матрикса с уже частично сформированной новой тканью. После имплантации вместо дефекта тканеинженерная конструкция должна сохранить свою структуру и функции в течение периода времени, необходимого для восстановления нормально функционирующей ткани в месте дефекта и интегрироваться с окружающими тканями.

Цель работы – конструирование гибридных тканеинженерных биосистем для восстановления повреждений кожи на основе материалов биотехнологического происхождения (биосовместимых и резорбируемых полиэфиров полигидроксиалканоатов и бактериальной целлюлозы).

Материалы и методы. Пленки бактериальной целлюлозы (БЦ) получали в культуре уксуснокислых бактерий *Komagataeibacter xylinus* В-12068; источником биоразрушаемых сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) служила культура хемолитоавтотрофных бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646.

Результаты. Сконструирована серия гибридов на основе БЦ и П(ЗГБ/4ГБ) с использованием различных методов: 1 вариант – высушенную пленку БЦ и сырую (пропитанную хлороформом) пропитывали в 2% и 5% растворе П(ЗГБ/4ГБ); 2 вариант – высушенную пленку заливали 2% раствором П(ЗГБ/4ГБ) и выдерживали в течение 24 ч, затем сушили в беспылевом боксе до полного удаления растворителя; 3 вариант – нетканое волокно, обрастало пленкой бактериальной целлюлозы синтезированной в культуре *K.xylinus* В-12068 в статических условиях поверхностным способом; 4 вариант – измельченную

целлюлозу (размер частиц 120 мкм) добавляли в 3% раствор П(ЗГБ/4ГБ), перемешивали с помощью ультразвука до получения гомогенного раствора, затем получали пленки методом испарения растворителя в следующем соотношении-полимер: целлюлоза – 2:1; 1:1; 5 вариант – измельченный порошок П(ЗГБ/4ГБ) добавляли в культуральную среду и выращивали в культуре *K.bacterxylinus* B-12068 поверхностным способом; 6 вариант – нетканое волокно, обрастало пленкой бактериальной целлюлозы синтезированной в культуре *K.rxylinus* B-12068 глубинным способом (рис. 1).

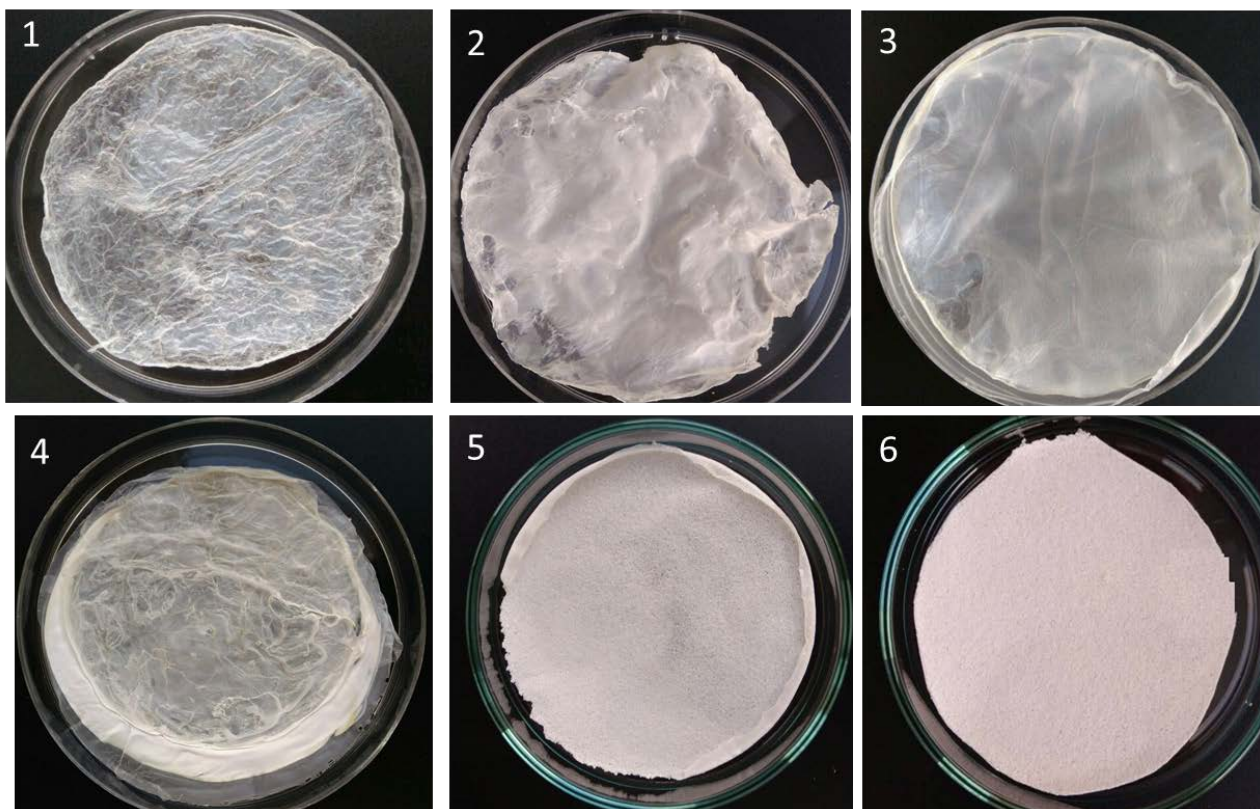


Рисунок 1 – Фото гибридов на основе БЦ и П(ЗГБ/4ГБ), полученных разными методами: 1 – БЦ+2% р-р П(ЗГБ/4ГБ); 2 – БЦ+5% р-р П(ЗГБ/4ГБ); 3 – БЦ+2% р-р П(ЗГБ/4ГБ), пропитывали 24 ч; 4 – мокрая БЦ+2% р-р П(ЗГБ/4ГБ); 5 – П(ЗГБ/4ГБ)+ крошка БЦ (2:1); 6 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1)

Образцы, полученные в результате добавления нетканого волокна и порошка БЦ в культуру уксуснокислых бактерий, а также образцы после пропитки 5% р-ом сополимера П(ЗГБ/4ГБ) в высушенном состоянии не имели четкой структуры (рис. 2) и обладали низкими механическими характеристики (таблица).

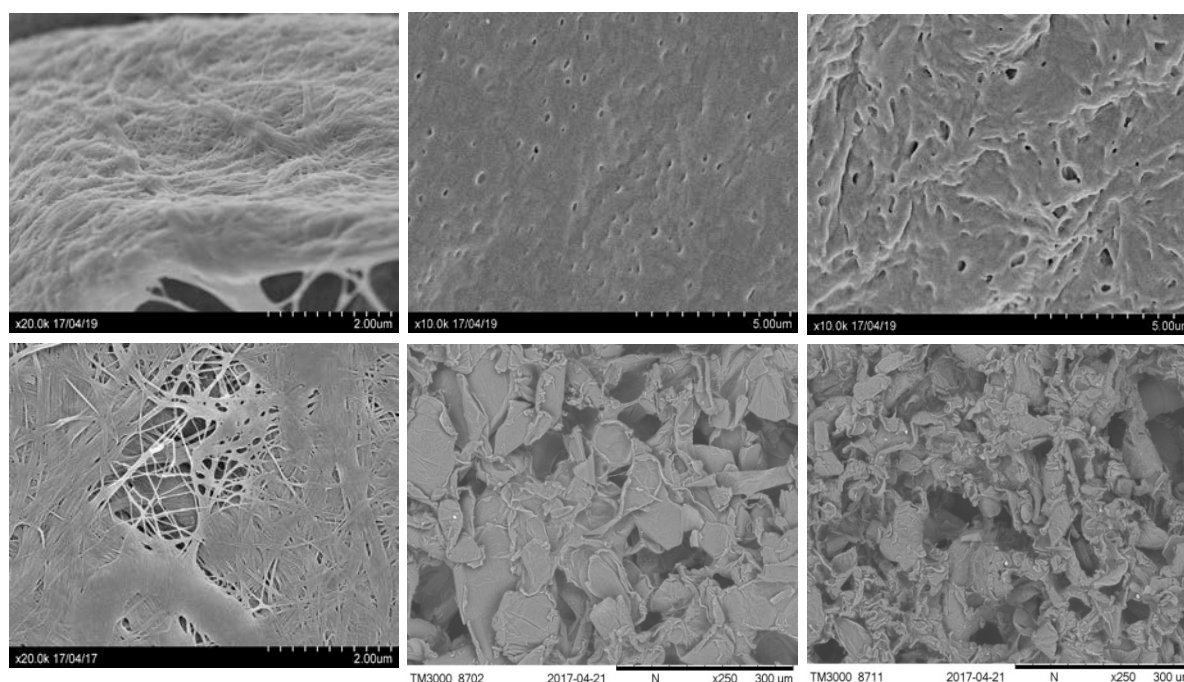


Рисунок 2 – РЭМ-снимки поверхности гибридов на основе БЦ и П(ЗГБ/4ГБ), полученных разными методами (нумерация – аналогично рис.1)

Таблица – Физико-механические характеристики гибридов на основе БЦ и П(ЗГБ/4ГБ)

Название образца	Модуль Юнга, МПа	Напряжение при разрушении, МПа	Деформация при разрушении, %
Исходная БЦ	2060,4	33,47	1,75
БЦ+нетканое	272,33	8,67	3,65
П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (2:1)	65,08	0,88	3,45
П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1)	63,41	0,83	3,47
БЦ+2% р-р П(ЗГБ/4ГБ)	110,99	6,65	6,25
мокрая БЦ+2% р-р П(ЗГБ/4ГБ)	146,76	5,63	5,71

Лучшие варианты гибридов по способности поддерживать пролиферацию клеток фибробластического ряда получены при использовании метода испарения растворителя в следующем соотношении – полимер: целлюлоза – 2:1. Эти типы гибридов были нагружены лекарственными препаратами, стимулирующими ранозаживление, и исследованы в культуре фибробластов. Наиболее благоприятными для выращивания фибробластов оказались образцы гибридов, полученные и нагруженные актовегином или солкосерилом на 5 % (рис. 3).

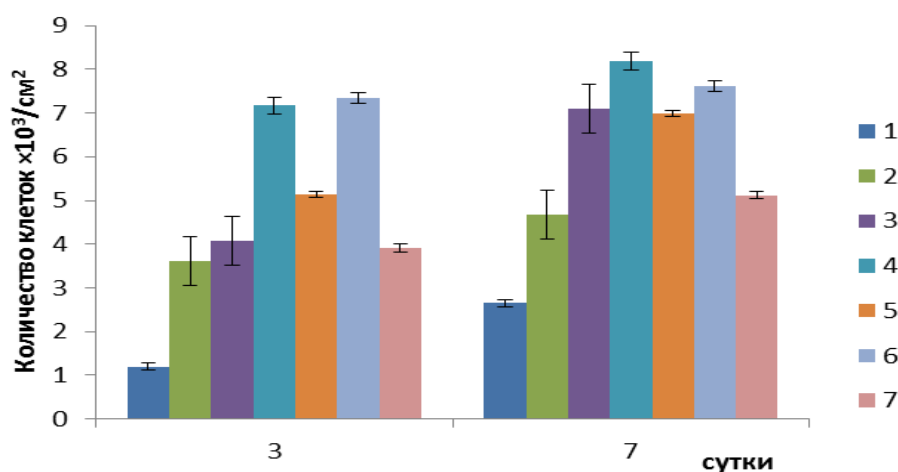


Рисунок 3 – Количество жизнеспособных фибробластов, культивируемых на гибридных скаффолдах БЦ/П(ЗГБ/4ГБ)/лекарственные средства: 1 – контроль (полистирол); 2 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (2:1); 3 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1); 4 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1) + актовегин (5%); 5 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1) + актовегин (1%); 6 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1) + солкосерил(5%); 7 – П(ЗГБ/4ГБ) + крошка БЦ (1:1) + солкосерил (1%) (MTT тест)

Заключение. Сконструированы гибридные системы в качестве опорных носителей для культивирования клеток на основе бактериальной целлюлозы и резорбируемых сополимеров П(ЗГБ/4ГБ), обладающих свойствами эластомеров. По результатам исследования свойств поверхности и физико-механических свойств наиболее пригодными в качестве скаффолдов признаны образцы в сочетании с лекарственными препаратами, оказывающие стимулирующее действие на фибробласты и перспективные в качестве раневых повязок для восстановления дефектов кожных покровов.

Acknowledgments

The reported study was funded by RFBR and Government of Krasnoyarsk Territory according to the research project № 16-43-242024

ADDITIVE MANUFACTURING AND PATIENT SPECIFIC IMPLANTS

Vasif Hasirci^{1,2}

¹Middle East Technical University (METU), Department of Biological Sciences and

²BIOMATEN, METU CoE in Biomaterials and Tissue Engineering, Ankara, Turkey

E-mail: vhasirci@metu.edu.tr

Implants are materials that are designed and produced to partially or completely take over the function of natural tissues. They are produced in different sizes to be used as off-the-shelf devices. This is quite satisfactory for most of the implants such total hip prosthesis, intraocular lenses, and sutures. There are, however, cases where the implant has to be modified in the operating room to more closely fit the defect of the patient. This is especially true with polymeric implants used in fixing irregular defects. With the development of various computer controlled electromechanical devices and imaging systems it is now possible to manufacture implants specifically for an individual patient. The production process has a large number of variations but all share the same common approach: the building of the product in a layer-on top of-layer bottom up approach leading to the name additive manufacturing. The most commonly used approach is FDM, fiber deposition modelling, where a thermoplastic polymer is melted and extruded through a

micron sized orifice drawing lines according to the computerized information obtained from a scan of the defect of the patient. Below a PCL based implant and its interaction with bone cells is presented. Among the many important parameters to be controlled are pore and fiber dimensions, chemistry, degradation rate, mechanical and thermal properties of the polymer used. The cells in the figure are apparently interacting extensively with the polymer showing that the 3D-product will serve the purpose. Examples in this will be presented.

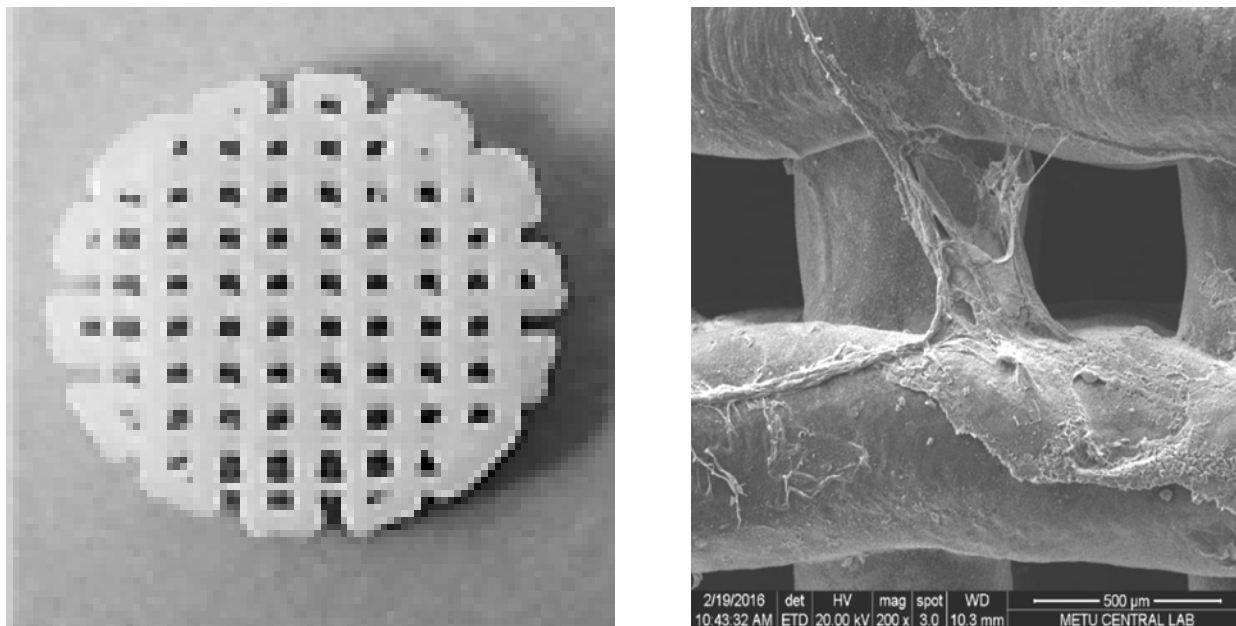


Figure – Polycaprolactone implant and its interaction with bone cells [1]

References

1. S. Buyuksungur et al, Ph.D. thesis, METU

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ В МОДЕЛИРОВАНИИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА IN VITRO

**А.В. Моргун, Е.Д. Хилажева, Е.Б. Бойцова, Н.В. Писарева, В.В. Салмин, А.Н. Шуваев,
Н.А. Малиновская, Е.А. Пожиленкова, Я.В. Горина, А.Б. Салмина**

*ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России,
г. Красноярск, ул. Партизана Железняка 1, Россия*

E-mail: allasalmina@mail.ru

Моделирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – одна из важнейших задач нейробиологии и нейромедицины. Применение моделей ГЭБ *in vitro* обеспечивает возможность изучения механизмов межклеточных взаимодействий в головном мозге в физиологических и патофизиологических условиях, поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ, а также исследования фармакокинетических свойств потенциальных нейротропных лекарственных препаратов. В настоящее время при моделировании ГЭБ *in vitro* используются моноклеточные (включающие один тип клеток) и мультиклеточные модели (сокультивирование двух и более типов клеток – астроцитов, нейронов, эндотелиоцитов, перицитов). В зависимости от происхождения клеток, входящих в состав моделей ГЭБ, выделяют модели с использованием клеток немозгового

происхождения, модели с использованием клеток мозгового происхождения и комбинированные модели с использованием клеток мозгового и немозгового происхождения [2]. Таким образом, в арсенале ученых имеется достаточный выбор способов моделирования ГЭБ *in vitro* в зависимости от поставленных целей и задач. Обеспечить воспроизведение условий, наиболее приближенных к реальным условиям функционирования клеток в организме, позволяет применение микрофлюидных технологий. Благодаря наличию постоянного микропотока жидкости, обеспечивающего изменения концентраций веществ, поступающих к клеткам и высвобождающихся из них, возможно создание новых динамических моделей ГЭБ *in vitro*, наиболее полно отражающих события в головном мозге в условиях *in vivo* [1].

Цель работы. Создание моделей ГЭБ *in vitro* для различных биомедицинских приложений.

Материалы и методы. Материалом для создания моделей ГЭБ *in vitro* служили первичные культуры клеток астроцитов, нейронов и церебральных эндотелиоцитов, выделенные из головного мозга эмбрионов крыс по описанной ранее методике [3]. После получения культур клеток-компонентов моделировали статические и динамические модели ГЭБ.

Для создания статической трехкомпонентной модели ГЭБ *in vitro* на дно 12-луночного планшета засевали астроциты и нейроны в соотношении 2:1, после чего на культуральные вставки добавляли церебральные эндотелиоциты. Далее клетки-компоненты ГЭБ сокультивировали в среде DMEM с 10% FBS, 0,58 мг/мл глутамина, 100 У/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина в условиях CO₂-инкубатора.

Для создания динамической модели ГЭБ использовали систему микроперфузии CellASIC ONIX (Merck Millipore). В камеру планшета для микрофлюидной установки засевались клетки-компоненты ГЭБ для формирования трехмерной модели, при этом астроциты и нейроны были отделены от церебральных эндотелиоцитов мембраной. Клетки культивировались в среде DMEM с 10% FBS, 0,58 мг/мл глутамина, 100 У/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина при физиологической скорости потока культуральной среды, при 37°C и 5% CO₂.

Для идентификации типа клеток в составе ГЭБ с помощью иммуоцитохимического анализа определяли следующие маркеры: нейронспецифическую енолазу (NSE), глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP) и фактор Виллебранда (vWf). Для оценки формирования функциональных связей между клетками ГЭБ регистрировали наличие основного структурного компонента щелевых контактов, коннексина 43 (Cx43) и белка плотных контактов ZO-1. Для оценки межклеточных взаимодействий иммуоцитохимически определяли экспрессию различных подтипов мембранных транспортеров (транспортеры лактата, глюкозы, глутамата). Проницаемость ГЭБ *in vitro* оценивали по уровню трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER).

Полученные результаты. При формировании трехкомпонентных моделей ГЭБ *in vitro* соотношение астроцитов, нейронов и церебральных эндотелиоцитов составило 2:1:1, что соответствует физиологическим нейрон-глиальным показателям головного мозга. Все эндотелиоциты в составе трехклеточных моделей экспрессировали ZO-1, что характерно для эндотелиоцитов ГЭБ. В моделях ГЭБ была определена доля клеток, экспрессирующих Cx43 для нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов. Выявление в моделях ГЭБ белков ZO-1 и Cx43 указывает на возможность ее использования для изучения особенностей нейрон-астроглиальных, астроцит-эндотелиальных взаимодействий и энергетического сопряжения в норме и при заболеваниях головного мозга.

Разработанные модели ГЭБ продемонстрировали возможность применения их для моделирования нейровоспаления, в частности, при изучении молекулярных механизмов

повреждения ГЭБ при нейроинфекциях, характеризующихся патологической гиперпроницаемостью барьера, а также для оценки проницаемости ГЭБ при различных воздействиях, имеющих своей целью достижение обратимого, контролируемого открытия ГЭБ (с регистрацией проницаемости барьера для модельных ксенобиотиков и молекулярных комплексов). Мы установили, что для решения таких задач наибольшей информативностью обладают параметры, характеризующие структурно-функциональную целостность ГЭБ *in vitro*, в частности, экспрессия белков тесных контактов (эндотелиоцит-эндотелиальное сопряжение), щелевых контактов (астроцит-астроглиальное сопряжение), белков-транспортёров (астроцит-эндотелиальной и нейрон-астроглиальное сопряжение).

Заключение. Полученные статическая и динамическая модели ГЭБ *in vitro* могут использоваться для изучения межклеточных взаимодействий в головном мозге, для тестирования препаратов с потенциальной нейротропной активностью, для моделирования различных (пато)физиологических состояний в центральной нервной системе.

Работа (фрагмент по оценке нейровоспаления) выполнена при поддержке гранта РФФИ-ККФПНиНТД (проект № 16-44-243073).

Литература

1. Booth, R., Kim H. Characterization of a microfluidic *in vitro* model of the blood-brain barrier (mu BBB) [Text] / R. Booth, H. Kim // Lab. Chip. -2012. -Vol. 12.- P. 1784-1792.
2. Моргун, А.В. Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: современное состояние проблемы и перспективы [Текст] / А.В. Моргун, Н.В. Кувачева, Ю.К. Комлева и др.// Анналы клинической и экспериментальной неврологии.- 2012.- № 4.- С.42-50.
3. Хилажева, Е.Д. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro* [Текст] / Е.Д. Хилажева, Е.Б. Бойцова, Е.А. Пожиленкова и др. // Цитология. – 2015. – №10.- С.710-713.

НОВЫЕ БИОСКАФФОЛДЫ С ЗАДААННЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО АНГИОГЕНЕЗА IN VITRO

**В.В. Салмин, Е.Д. Хилажева, Е.Б. Бойцова, Н.В. Писарева, К.А. Небесная,
П.В. Лаврентьев, А.Б. Салмина, А.В. Моргун**

*ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора
В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Красноярск, Россия*

E-mail: vsalmin@gmail.com

Высокая локальная концентрация лактата, источником которого являются периваскулярные астроциты, обладает высоким проангиогенным потенциалом эндотелиальных клеток головного мозга [5]. Лактат рассматривается, как один из ключевых регуляторов церебрального ангиогенеза [4]. Регенерация поврежденных и/или утраченных тканей относится к сложным и важным проблемам современной регенеративной медицины. Классическое замещение таких дефектов аутологичными или гомологичными тканями имеет ряд ограничений и недостатков, которые не могут обеспечить полноценное восстановление функциональной активности органов и тканей. Особенно актуальной указанная проблема становится при повреждении нервной ткани.

Существующие системы оценки и изучения особенностей пролиферации клеток, ангиогенеза, репаративных процессов *in vitro* содержат биополимерный каркас (матригель,

желатин, коллаген, фибронектин или их аналоги) на котором располагаются эндотелиальные клетки 3. Такой подход имитации матрикса базальной мембраны редко позволяет воспроизвести микроокружение, которое необходимо для пролиферации и дифференцировки молодых клеток. Мы разработали и создали желатиновый скаффолд способный высвобождать лактат непосредственно на поверхности, вблизи эндотелиоцитов, что имитирует высвобождение лактата периваскулярными астроцитами *in vivo*.

Цель работы – установить общие характеристики желатиновых скаффолдов, которые высвобождают лактат и могут являться значимыми для модулирования церебрального ангиогенеза *in vitro*, а также особенности ангиогенеза на их поверхности при культивировании церебрального эндотелия крыс.

Материалы и методы. Для изготовления желатиновых скаффолдов с градиентом лактата (до 2 мМ), использовали фото пленку марки ВРП-М (ПО «Славич»): удаляли галогенид серебра и сенсibiliзирующий краситель; сушили и нарезали скаффолды диаметром 16 мм; насыщали одну половину скаффолда в 40% растворе лактата. Скаффолды помещали на дно 12-луночного планшета и осуществляли культивирование клеток, которые засевали на границу раздела половинок с лактатом и без лактата (5×10^4 на скаффолд).

Выделение и культивирование эндотелиоцитов проводили по модифицированному протоколу предложенному Y. Liu с соавторами [1].

Оценка параметров ангиогенеза проводили путем регистрации числа сформированных петель, площади внутри петель (мм^2), длины периметра петель (мм) [2] в фиксированной области зоны «ангиогенеза» размером 0,5x1 мм с каждой стороны относительно границы между половинками скаффолда с лактатом и без лактата в течение 30-390 мин после посадки клеток.

Иммуногистохимические исследования выполнены по стандартной методике одновременного или последовательного комбинированного окрашивания препарата; регистрацию апоптоза – с помощью метода TUNEL; регистрацию экспрессии мРНК – методом ПЦР в реальном времени.

Статистический анализ представлен в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение. Использовали критерии Манна–Уитни, Уилкоксона, χ^2 , ранговые корреляции по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ и менее. Дополнительно определяли фрактальную размерность и форму фактора петель сосудов при ангиогенезе на скаффолдах.

Результаты. В зоне желатинового скаффолда, где активно высвобождается лактат, через 48 часов регистрируется большее число петель по сравнению с зоной без лактата. Средняя площадь петли и длина периметра петель в этой зоне статистически значимо больше. Эти различия имеют время-зависимый характер: ангиогенез интенсифицируется после 300-ой минуты культивирования, что соответствует постоянной времени выхода лактата в среду инкубации. При детекции особенностей экспрессии молекул Cav-1, Ki-67, ZO-1 и выраженности апоптоза выявлены отличия, характеризующие особенности церебрального ангиогенеза в зоне с разной концентрацией лактата. Эти особенности подтверждаются результатами анализа экспрессионного профиля мРНК методом ПЦР в реальном времени: в зоне скаффолдов, выделяющих лактат, зафиксировано достоверно значимое увеличение экспрессии мРНК HIF-1, CD147, GPR81, VEGFR2. Оценивая формы петель, с использованием параметра фрактальной размерности D и геометрического фактора F, мы определили параметры линейного тренда для всех типов скаффолдов. Установлено, что параметры фрактальной размерности и форм факторы находятся в сильной корреляционной связи $R = 0,98$ для лактатной зоны и $R = 0,98$ – для безлактатной.

Заключение. Полученные результаты с использованием оригинальных биоскаффолдов, выделяющих лактат, соответствуют современным представлениям о том,

что пространственные, топологические и фрактальные свойства капиллярных сетей позволяют в достаточной мере охарактеризовать ключевые параметры ангиогенеза *in vitro*. Использование скаффолдов, имитирующих микроокружение *in vitro*, расширяет возможности для изучения особенностей ангиогенеза, а также влияния на него различных модуляторов *in vitro*.

Моделирование ангиогенеза *in vitro* с использованием церебрального эндотелия и желатиновых скаффолдов, выделяющих лактат, обладает рядом преимуществ, включая точный контроль динамики роста клеток, изменения компонентов внеклеточного матрикса и среды, возможность использования разнообразных методов для таргетной модуляции ангиогенных свойств эндотелиальных клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект N 14-25-00054).

Литература

1. Liu, Y. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells / Y. Liu, Q. Xue, Q. Tang et al. // Microvasc Res. – 2013. – № 90. – P. 199-205.
2. Staton, C.A. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays / C.A. Staton, M.W. Reed, N.J. Brown // Int J Exp Pathol. – 2009. – № 3. – P. 195-221.
3. Hielscher, A. Fibronectin deposition participates in extracellular matrix assembly and vascular morphogenesis / A. Hielscher, K. Ellis, C. Qiu et al. // PLoS One. – 2016. – № 1. – e0147600.
4. Ruan, G.X. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis / G.X. Ruan, A. Kazlauskas // J Biol Chem. – 2013. – № 29. – P. 21161–21172.
5. Salmina, A.B. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function / A.B. Salmina, N.V. Kuvacheva, A.V. Morgun et al. // Int J Biochem Cell Biol. – 2015. – № 64. – P. 174-184.

ПИОНЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГИБРИДНЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ БИОСИСТЕМ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

**А.А. Шумилова¹, Е.Д. Николаева², И.П. Шидловский¹, А.К. Кириченко²,
Е.И. Шишацкая^{1,3}**

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

²Красноярский государственный медицинский университет им. проф. Войно-Ясенецкого, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1. Россия.

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), г. Красноярск, Академгородок, 50/50. Россия

E-mail: shumilova.ann@mail.ru

Оптимизация процесса заживления дефектов и заболеваний кожи с помощью новых технологий и материалов является актуальной проблемой фундаментальной науки и клинической практики. Связано это с постоянным ростом количества повреждений вследствие ожогов, травм, хирургических вмешательств, онко- и различных заболеваний. Круг хирургических и лечебных средств, применяемых для закрытия и восстановления

дефектов кожных покровов, а также материалов и медикаментов, используемых для их изготовления, насчитывает сотни наименований. Материалы для раневых покрытий должны обладать свойствами, необходимыми для конкретного типа повреждения, а также с учетом течения и фазы раневого процесса. Актуальное и быстро развивающееся направление, ориентированное на восстановление дефектов кожных покровов – это тканевая инженерия кожи 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 (scaffold); далее биоинженерную конструкцию или сформированную ткань имплантируют реципиентному организму.

Цель работы – исследование эффективности применения гибридных раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы и резорбируемых биополимеров для терапии модельных ожогов в эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы. Моделирование ожогового поражения кожи III степени произведено наркотизированным крысам Вистар (внутримышечно медитин 0,2 мл, пропופол 0,3 мл). Перед операцией в межлопаточной области выбривали участок размером 3 см². Нанесение ожога производили при помощи стальной печатки диаметром 15 мм, нагретой до 100 °С в кипящей воде в течение 10 мин. Время экспозиции на ране 8 секунд. В экспериментальных группах кожный дефект закрывали 3 типами разработанных раневых покрытий: гибридное покрытие сополимер/БЦ; гибридное покрытие сополимер/БЦ + актовегин; гибридное покрытие сополимер/БЦ + дифференцированные из ММСК фибробласты; в контроле использована повязка Воскопран. Раны закрывали стерильной марлевой повязкой, фиксированной к пластиковому кольцу одиночными швами.

Результаты. Критериями оценки эффективности ранозаживления служили: планиметрия ран и гистологическая техника, скорость восстановления и полноценность кожного покрова, детектирование молекулярных маркеров ангиогенеза (VEGF), воспаления (TNF-α), коллагена 1-го типа (Col-1) (показатель формирования соединительной ткани), кератина 10 (K10) и кератина 14 (K14) (показатели формирования шиповатого и зернистого слоев эпидермиса). Измерения площади ран показали, что в экспериментальных группах регенерация происходила быстрее. При использовании гибридного раневого покрытия «сополимер/БЦ + актовегин». На 3-й день площадь раны под этим покрытием составила 1 см² (67% от исходной); на 7-й день 33%, на 14 день 7,3%. При использовании покрытия «сополимер/БЦ + дифференцированные фибробласты» заживления была сопоставимым: на 3-й день площадь раны составила 69,3 %, на 7-й день 40%, на 14 день – 9%. В группе с гибридным покрытием без клеток заживление дефекта было несколько менее активным. В конце эксперимента площадь дефекта составила порядка 12 %. В контрольной группе результат достоверно отличался от экспериментальных групп; остаточная площадь раны составила на 14 день 30,6 % от начальной площади раны.

Заключение. Разработанные экспериментальные раневые покрытия на основе разрушаемых биополимеров «полигидроксикапроаты/бактериальная целлюлоза» положительно оценены в эксперименте на лабораторных животных с модельным повреждением кожных покровов (ожог III-й степени). Регенерация дефекта происходила значительно быстрее в трех экспериментальных группах по сравнению с контролем (коммерческий препарат Воскопран).

Acknowledgments

The reported study was funded by RFBR and Government of Krasnoyarsk Territory according to the research project № 16-43-242024

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ УРОЛОГИЧЕСКИХ СТЕНТОВ НА ОСНОВЕ РЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

А.Н. Бояндин¹, В.В. Усенко², М.П. Мылтыгашев³

¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Академгородок, 50/50

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, пр. Свободный, 79

³ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. Войно-Ясенецкого

E-mail: araneus@mail.ru

Стентирование является важной реконструктивной процедурой в клинической практике в урологии. Материалы, используемые для изготовления урологических стентов, должны характеризоваться высокой биологической совместимостью и не вызвать негативных реакций со стороны тканей в месте имплантации. Стенты должны быть прочными и при этом обладать достаточной эластичностью. Последнее не всегда достижимо при переработке биополиэфиров методом экструзии из расплавов, что требует поиска других способов получения материалов в форме трубок.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) микробного синтеза представляют собой семейство биосовместимых и биоразрушаемых полиэфиров различного химического строения с различными базовыми свойствами, от высококристаллических термопластов до конструкционных эластомеров, что делает их важными материалами для медицины. Биоразрушаемый поликапролактон также рассматривается в качестве перспективного материала медицинского назначения, в том числе для изготовления различных эндопротезов, носителей для клеток, матриксов для депонирования лекарственных и биологически активных веществ и др.

Цель работы – конструирование полимерных стентов на основе биоразрушаемых полиэфиров методом испарения из раствора.

Материалы и методы. Для изготовления стентов использовали образцы полигидроксиалканоатов (ПГА) различного состава: гомополимер поли-3-гидроксibuтирата (П(ЗГБ)) и два типа сополимеров – поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат (П(ЗГБ/ЗГВ)) и поли-3-гидроксibuтират-4-гидроксibuтират (П(ЗГБ/4ГБ)). Бактериальные ПГА были получены микробным биосинтезом с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 в различных режимах культивирования, выделены и очищены пересадкой в систему «хлороформ-гексан». Поли-ε-капролактон ($M_w=169$ кДа, ПД=1.86) приобретался у фирмы Sigma-Aldrich. Остальные реагенты приобретались уровня чистоты «ч.д.а.» или выше у различных производителей.

Для конструирования урологических стентов использовали технологию испарения растворителя из полимерных растворов. В качестве матрицы использовали силиконовые трубки, в которые заливали хлороформные растворы полимеров различной концентрации и выдерживали при комнатной температуре в беспылевом боксе до полного испарения растворителя. Полимерные стенты были получены двумя методами. В первом, статическом, варианте полую силиконовую трубку с зажимом на нижнем конце для предотвращения вытекания раствора вертикально закрепляли в штативе, заполняли раствором полимера и оставляли в таком состоянии до полного испарения растворителя. В динамическом режиме для испарения растворителя трубки в процессе их формирования регулярно переворачивали, оставляя оба конца открытыми, также до полного испарения растворителя.

Результаты. В процессе испарения растворителя выявлена способность ПГА к формированию полых полимерных трубок как прототипов стентов. При статическом режиме испарения растворителя не удалось получить трубки с равномерной толщиной стенок по

всей длине. В верхних точках измерения (примерно 10 см) толщина стенок была минимальной, составив 0,014-0,015 мм у трубок, полученных из растворов П(ЗГБ), и 0,010-0,014 мм у трубок, полученных из растворов сополимера П(ЗГБ/ЗГВ). Так, при использовании трубок длиной 30 см, начиная примерно с 15 см от верха трубки, отмечено утолщение ее стенок; толщина стенок постепенно возрастала по мере удаления от верха трубки к нижней ее части, очевидно, в результате увеличения концентрации полимерного раствора, стекающего внутри силиконовой трубки-матрицы под силой тяжести. В последних точках измерения (на уровне 25-20 см) толщина стенок составила 0,051 и 0,072 мм при использовании 2-х и 3%-х растворов П(ЗГБ), и 0,099 и 0,106 мм при использовании аналогичных растворов П(ЗГБ/ЗГВ). Полученные значения толщины стенок трубок низкие и не являются приемлемыми для стентирования. Данный метод непригодным для получения стентов с удовлетворительными и стабильными геометрическими показателями.

Предпринята попытка получения трубок большего диаметра с применением силиконовых трубок-шаблонов диаметром 4 и 6 мм. Однако в случае использования растворов П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) с увеличением диаметра силиконовой трубки-шаблона стенки стентов значительно истончались.

Следующим шагом стало исследование метода получения трубок, заключающегося в переворачивании, из растворов сополимера П(ЗГБ/4ГБ) с содержанием мономеров 4-гидроксibuтирата 10 и 30 мол.%. Сополимеры, содержащие мономеры 4ГБ, имеют существенно сниженную степень кристалличности и реологические характеристики, отличающиеся от растворов высококристаллических П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), у которых значения динамической вязкости на порядки выше.

Существенно сниженные значения динамической вязкости растворов сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) позволили в ходе отработки технологии получения стентов использовать более концентрированные растворы, от 2-3 до 10 %. Полученные стенты имели длину от 10 до 30 см с равномерной толщиной стенок практически по всей длине трубок.

Варьирование концентрации растворов (5, 10%) сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) с содержанием мономеров 4ГБ от 10 до 30 мол.% в результате переворачивания позволило получить образцы хорошего качества с более плотными стенками толщиной от 0,10 до 0,25 мм, равномерной по всей длине трубок. Аналогичный положительный результат получен при использовании композитных растворов, образованных П(ЗГБ) и поликапролактоном (ПКЛ).

Сформированные смесовые растворы П(ЗГБ) и ПКЛ с различным соотношении компонентов исследованы для получения образцов урологических стентов. Были взяты следующие соотношения П(ЗГБ)/ПКЛ – 10/90; 25/75 по массе, из которых были приготовлены растворы концентрацией 10%. Лучшие результаты получены при использовании 10%-х растворов с соотношением П(ЗГБ)/ПКЛ как 25/75. Применение П(ЗГБ/4ГБ) и П(ЗГБ)/ПКЛ заданной концентрации для изготовления трубок технологией литья растворов с последующим испарением растворителя в динамическом режиме обеспечило получения набора экспериментальных образцов урологических стентов.

Важным показателем биосовместимости имплантируемых изделий служит физико-химическая реактивность поверхности. Поверхностная топография, шероховатость, структура, адгезивные свойства – факторы, оказывающие влияние на взаимодействие поверхности с клетками крови и тканей, а также компонентами биологических жидкостей. По данным электронной микроскопии внутренней поверхности исследуемых стентов показано, что стенки полых полимерных трубок изнутри имели небольшие шероховатости и поры до 10 мкм, в отличие от гладких полиуретановых стентов. Внутренняя поверхность композитных стентов на основе композитов П(ЗГБ)/ПКЛ имела развитую систему волокон и пор размером от 10 до 100 мкм.

Заключение. Разработана методика получения полимерных трубок методом испарения из раствора; получена серия трубок с размерными характеристиками, пригодными для применения в качестве урологических стентов. В эксперименте на животных подтверждена эффективность разработанных на основе ПГА стентов и перспективность их применения при хирургическом лечении структуры полиуретанового о сегмента.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СТЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ПРИ ПЛАСТИКЕ ПИЛОУРЕТЕРАЛЬНОГО СИГМЕНТА

М. П. Мылтыгашев¹, А. Н. Бояндин^{2,3}, В. А. Усенко², Ф. П. Капсаргин¹, А. К. Кириченко¹, Е. И. Шишацкая^{2,3}

¹Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; кафедра урологии, андрологии и сексологии ИПО, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Желязняка 1, РФ

²Сибирский Федеральный Университет, 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, РФ

³Институт биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН), 660036 г. Красноярск, Академгородок 50/50. РФ

E-mail: smallmirg@mail.ru

Рост малоинвазивных технологий в реконструктивной хирургии в последние годы привел к тому, что современную медицину трудно представить без дренирующих вмешательств с использованием стентов. Число операций в группе больных с патологиями в гепато-панкреато-билиарной зоне и верхних мочевых путях неуклонно растет. Нарушение пассажа с дилатацией проксимальнее места сужения в различные сроки после реконструкции мочеточника развивается в 6,5–37 %. Количество инфекционных осложнений напрямую зависит от таких факторов, как обструкция и нарушение сфинктерной функции в зоне соустья и, как следствие, развития рефлюкса или восходящей инфекции. Наиболее прогнозируемыми вариантами профилактики этих осложнений являются совершенствование техники выполнения анастомоза и дренирование зоны соустья установкой стента.

Цель работы – исследование эффективности применения биodeградируемых стентов на основе ПГА для дренирования верхних мочевых путей после реконструктивно-пластической операции.

Материалы и методы. В исследовании использовали экспериментальные образцы полимерных стентов на основе: сополимера поли-3-гидроксibuтирата с поли-4-гидроксibuтиротом П(ЗГБ/4ГБ) с включением 4ГБ 30% (молекулярная масса которого составляет 800 кDa, полидисперсность $1,76 \pm 0,04$, кристалличность 50%, среднее отн. удлинение 392,8%); смесь поли-3-гидроксibuтирата с поликапролактоном П(ЗГБ)/ПКЛ с включением ПКЛ 75% (среднее отн. удлинение 495,49 %); стенты из полиуретана (производитель «Coloplast»). Морфофункциональные изменения стентированного мочеточника изучены на 45 кроликах-самцах породы «Советская шиншилла» массой 4550 – 5200 г, стенты устанавливали в пиелоуретеральный сегмент (ПУС). Животных выводили из эксперимента путем передозировки наркоза через 7, 14 и 28 сут. наблюдения. Морфологическому исследованию подвергали фрагменты мочеточника, ПУС в зоне стояния стента (в каждом случае иссекали участок размерами 0,5 x 0,5 см). Измеряли толщину уротелия, мышечной оболочки, проводили оценку воспалительной инфильтрации пиелоуретерального сегмента. Микроскопическое исследование и фотофиксацию приводили

с применением светового микроскопа CarlZeiss Imager.A1 («CarlZeiss», Германия), с адаптированной цифровой фотокамерой AxioCamMRc 5.0.

Результаты. Все животные удовлетворительно перенесли операции, интраоперационных осложнений ни в одном случае не зафиксировано. При морфологическом исследовании поперечных срезов мочеточника у животных контрольной группы (полиуретан) на 7-е сутки эксперимента, отмечалось утолщение стенок мочеточника вследствие гипертрофии мышечного слоя и воспалительного отека подслизистого. Толщина слизистого слоя составила $74,3 \pm 8,5$ мкм, при этом уротелий был сохранен не везде. В группе с П(ЗГБ/4ГБ) на 7-е сутки без труда визуализировался полимерный стент, имеющий вид слабо эозинофильной полупрозрачной каймы. Уротелий сохранен на всем протяжении установленного стента, мышечный слой имел равномерную толщину, отек подслизистого не выражен. Эпителиальный пласт имел неравномерную толщину, составившую в среднем $111,7 \pm 17,6$ мкм. В группе с П(ЗГБ)/ПКЛ отек подслизистого слоя был незначительный. Имело место сегментарное истончение уротелия, толщина которого составила в среднем $124,5 \pm 12,5$ мкм.

На 14-е сутки после стентирования в препаратах контрольной группы отмечались дилатация мочеточника, гипертрофия и воспалительный отек его стенки, а также гиперпластические и десквамативные изменения уротелия. В эти же сроки в группе с П(ЗГБ/4ГБ), просвет мочеточника на уровне расположения стента был складчатый, минимально расширен в дистальном отделе. В группе исследования с П(ЗГБ)/ПКЛ на 14-е сутки определялся слабо выраженный отек собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистого слоя. На 28-е сутки эксперимента в контрольной группе толщина слизистого слоя мочеточника составила $74,2 \pm 8,1$ мкм, на большинстве участков уротелий отсутствовал. Гипертрофированная оболочка имела толщину $183,2 \pm 29,1$ мкм, с явлениями пролиферации соединительнотканых элементов. В экспериментальной группе П(ЗГБ/4ГБ) стенка мочеточника проксимальнее стояния стента сохраняла продольную складчатость. Слизистая мочеточника сохранена, без псевдополипозных разрастаний уротелия и дезэпителизированных участков. Уротелий мочеточников не утратил барьерных функций, поэтому стенка мочеточника не содержала воспалительных инфильтратов. В экспериментальной группе из П(ЗГБ)/ПКЛ складчатость мочеточника сохранена. Слизистая оболочка в основном имела гладкие контуры с равномерной толщиной переходного эпителия $112,4 \pm 8,5$ мкм. Отмечена некоторая разрыхленность собственной пластинки слизистой и подслизистого слоя, однако воспалительная инфильтрация отсутствовала, толщина мышечного слоя составила $163,20 \pm 20,7$ мкм.

Заключение. Использование биodeградируемых стентов на основе ПГА для дренирования верхних мочевых путей позволяет сохранить перистальтику, интактность водителя ритма и проводящих путей проксимального отрезка мочеточника, предупреждает возникновение воспалительных изменений в области операции.

CULTURE OF MONOCYTES AS AN IN VITRO EVALUATION SYSTEM FOR BIONANOMATERIALS DESIGNATED

N.G. Menzianova¹, E.I. Shishatskaya^{1,2}

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

²Institute of Biophysics SBAS, Akademgorodok, 50/50, 660036, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: shishatskaya@inbox.ru

Cytotoxicity, non-receptor signaling as well as the formation of the protein corona underlie the ambiguity of nanoparticles effects and reduce their effectiveness as therapeutic agents

and bioimplants [1]. Therefore, the establishment of effective evaluation systems for assessing of bionanomaterials biological activity *in vitro* is mandatory. Suitable assays allow selection of the most “safe” version of nano-sized particles and materials with nano-sized surface relief as well as facilitate their use for functional engineering in medicine. Short-term culture of monocytes, isolated from peripheral blood of healthy donors or patients, as a system for bionanomaterials screening is one of the biologically “reasonable” options. This approach is further supported by the fact that the clearance of PHA and biodegradation of nanocomposite implants *in vivo* depend largely on the functional activity of the monocyte-macrophage system. This approach is also applicable to the estimation of nano-material in the conditions of pathology. Analysis of integral parameters is sufficient to address the specific interim goals and select the most promising groups of bionanomaterials for further functionalization and application in medicine for the treatment of different nosologies.

The purpose of this work - is to investigate the feasibility of using monocyte short-term culture for *in vitro* evaluation of different bionanomaterials effects, utilizing changes in metabolic activity and cell morphology as end points.

Materials and methods. Bionanomaterials - particles, fibers and film substrates – were prepared from the group of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers, synthesized in culture *Ralstonia eutropha* B5786 in specific cultivation conditions. Monocytes were isolated from peripheral blood of healthy donors in the density gradient of urografin/Ficoll by utilizing the Recalde method [2]. The potential cytotoxicity of PHA was valuated by measuring the cellular reduction of MTT.

Results. We studied the feasibility of using a short-term culture of monocytes, isolated from peripheral donor blood, to assess the biological activity of different types of bionanomaterials: biodegradable polymeric particles, fiber and film substrates of micro- and nano-dimensions, which are either currently in use and/or potentially applicable in medicine. The cellular reduction of (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) is a well-established tool for assessing the viability/metabolic activity of cells. The scanning electron microscopy assay can detect fine changes in cell morphology. In the present study bionanomaterials have been shown to affect; in a size, chemical composition and morphological characteristics-dependent manner, the ability of monocytes to reduce MTT as well as their morphology.

Conclusion. In conclusion, the ability of monocytes to reduce MTT upon exposure to bionanomaterials of particular or fibrous morphology, under short term culture, is dependent on PHA-chemical composition, size and morphological characteristics. The effects were dependent on fiber orientation and concentration of particles in suspensions as well as on the existence of a protein corona. Short-term culture of monocytes is a potentially suitable model system for the evaluation of nanomaterials' biological effects. Further, research is needed in order to develop and validate these tests for the purpose of efficient PHA assessment in the conditions of pathology, e.g. atherosclerosis. It was established, that suggested approach will be applicable in the estimation of nano-structured biomaterials for the treatment of systemic diseases as the atherosclerotic lesion of coronary vessels.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 17-15-01352).

References

1. Neagu, M., et al., Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. Arch. Toxicol. 2016. 1e18. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1797-5>.
2. Recalde, H.R. A simple method of obtaining monocytes in suspension. J. Immunol. Methods 1984. V.69 (1), 71e77.

CYTOSTATIC DRUGS IN SIZE-CONTROLLED P(3HB) MICROCARRIERS

A.V. Murueva¹, A.M. Shershneva²

¹*Institute of Biophysics of the SB RAS 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

²*Siberian Federal University, 79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

E-mail: goreva_a@mail.ru

Low selectivity of action and high systemic toxicity of antitumor drugs represent the main problem of oncopharmacology and biopharmacology. Currently, active search capabilities are being used to reduce the toxicity of cytostatic drugs and increase their solubilization and selectivity of action. One of such methods is the development of new types of cytostatic drugs in the form of nano / microcarriers from biodegradable and biocompatible polymers.

Among the wide variety of polymers used for the preparation of nano/microcarriers, polyhydroxylalkanoates (PHA) are polyesters of hydroxycarboxylic acids, synthesized by microorganisms. This class of polyester attracts attention due to the presence of unique properties – biodegradation and biocompatibility. PHA are thermoplastic. These polymers do not affect on pH of tissues and have a long period of degradation *in vivo* compared with popular polylactides. Therefore, PHA are promising class of polymers for the development of effective drug delivery systems. In the present work, we used low molecular weight poly-3-hydroxybutyrate (P3HB), as a polymer matrix. The registered mark of the polymer products is BioplastotanTM.

The purpose of the work was to obtain and study of drugs loaded nano/microcarriers from poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and block copolymer with polyethylene glycol.

Materials and Methods. Paclitaxel-LENS (Russia), Doxorubicin-LENS (Russia), 5-fluorouracyl (Sigma-Aldrich, USA) were selected as a cytostatic drugs. These drugs are the most effective and often used in medical practice for the treatment of neoplastic diseases, such as breast cancer, lung cancer, ovarian cancer, prostate cancer, etc.

Nano- / microcarriers were obtained using different methods. Nano- / microspheres were obtained by the emulsion method. Microcapsules – were prepared by the spray-drying process on Mini-spray dryer B-290 («Laboratory equipment BUCHI», Switzerland). Micellar structures with polyethylene glycol were obtained by reaction of etherification and further dialysis and modified emulsion methods.

Results. It has been established that the chemical composition of drugs, as well as the presence of an oil component in the commercial dosage form of Paclitaxel contributed to the formation of a large and heterogeneous pores on the surface of microcapsules prepared by the spray-drying process. The surface of microspheres was smooth. The microcapsules had an average diameter of 3.5 μm and a zeta potential of the order of -44 mV. The average diameter of microspheres was 1.3 μm and zeta potential – -29 mV. The microcapsules loaded with hydrophilic 5-fluorouracyl had a regular spherical shape with the accumulation of drug on the surface. While nano- and microspheres containing Paclitaxel and 5-fluorouracyl did not have distinct differences in surface characteristics (Fig.). The average diameter and zeta potential of nanospheres with doxorubicin were 430 nm and -16 mV, respectively.

The obtained results allow to conclude that the chemical structure of drug affects the properties of carriers. Microcapsules obtained by spray-drying process had heterogeneous pores on the surface when the hydrophobic drug was encapsulated. Micro- and nanospheres prepared by emulsion method did not have such an effect. It should be noted that ζ potential of micro- and nanospheres ranged from -16 to -29 mV. However, ζ potential of microcapsules was much lower, from -40 to -46 mV. The difference in ζ potentials is probably due to the adsorption surfactants on surface of microparticles, which used in the emulsion method and absent in the spray-drying process.

Block copolymers were synthesized on basis of P(3HB) with PEG for obtaining micellar forms. PEGs were selected with different molecular weight and chemical composition. The formation of block copolymers was proved by NMR spectroscopy. In addition, the content of PEGs varied from 40 to 80%, depending on conditions of synthesis. The molecular weight distributions of block copolymers were an average of 6 kDa.

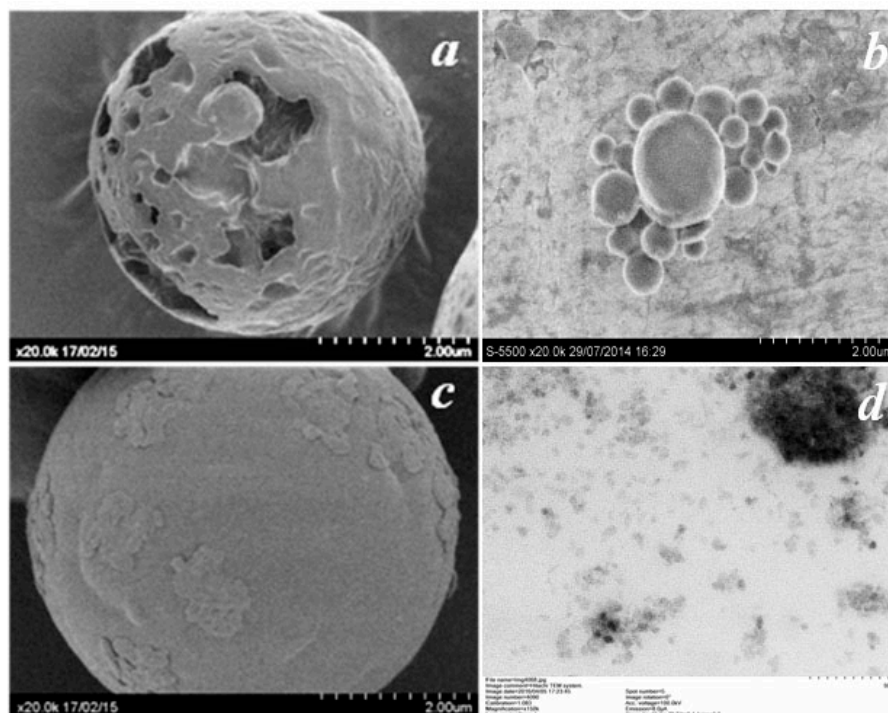


Figure – SEM images of the microcarriers prepared from PHA loaded cytostatic drugs: a – microcapsules with Paclitaxel; b – nanospheres with Paclitaxel; c – microcapsules with 5-fluorouracil; d – micelles with Doxorubicin

In order to obtain micellar targeting forms block copolymer with the $-NH_2$ group was chemical bonded with folic acid by carbodiimide method. Folic acid (FA) has a high binding ability with a folate receptors, which are expressed in primary and metastatic tumors (cancer of lung, kidney, endometrium, ovary, intestine and brain, etc.) [Masood F., 2016]. The fact of bonding block copolymer with folic acid was proved by NMR spectroscopy. Doxorubicin was deposited into micellar forms of directional action by dialysis and modified emulsion methods. The possibility of incorporating hydrophobic doxorubicin into the core of micelles is proved.

Based on the results of a morphological evaluation of the death of HeLa tumor cells, it has been shown that the use of the obtained deposited forms of cytostatics causes morphological changes associated with apoptosis (chromatin condensation, core fragmentation, margination of nucleus). Thus, the obtained nano / microcarriers can serve as a basis for the creation of new antitumor drugs of prolonged action, intended for various modes of administration.

Conclusion. The different microcarriers made from degradable 3-hydroxybutyric acid and block copolymer with polyethylene glycol were prepared using the emulsion method, spray-drying process and reaction of etherification. The experiments showed that by varying methods of preparations, one can prepare microcarriers with different properties, which would be suitable for drug loading. The effectiveness of the cytostatic drug loaded in microcarriers was proved in the culture of tumor cells – HeLa. Results of the study provided a basis for experiments on animals.

References

Masood, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy / F. Masood // Materials Science and Engineering C. – 2016. – V. 60. – P. 569–578.

КОМПЛЕКСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АЛКОКСИАМИНОВ И ИОНОВ МЕТАЛЛОВ: АГЕНТЫ ТЕРАНОСТИКИ И АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

М.В. Еделева^{1,2}, Д.А. Пархоменко^{1,2}, Н.А. Попова³, С.Р.А. Марк^{1,4}, Е.В. Третьяков^{1,2},
Е.Г. Багрянская^{1,2}

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова просп. Лаврентьева 9, Новосибирск, Россия

²Новосибирский Государственный университет, Пирогова 2, Новосибирск, Россия

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Коптюга

⁴Экс-Марсель Университет, г. Марсель, Франция

E-mail: edeleva@nioch.nsc.ru

К числу актуальных задач современной науки относятся создание новых медицинских препаратов и повышение эффективности существующих. В частности, все большую актуальность приобретает поиск методов терапии заболеваний, резистентных к антибиотикам, терапия антибластомных опухолей, проявляющих устойчивость к средствам химиотерапии.

Одним из методов улучшения действующего эффекта лекарственного препарата и уменьшения побочных явлений является его адресная доставка к пораженному органу или ткани. Создание комбинированных препаратов, сочетающих в себе адресную доставку, пролекарство и средство диагностики. Направление создания таких объектов получило название «Тераностика» – терапия и диагностика в одном агенте. Одним из классов агентов тераностики являются молекулы алкоксиаминов – аддуктов стабильных нитроксильных радикалов с алкилами. При нагревании происходит гомолиз алкоксиаминов с образованием нитроксила, который служит контрастным агентом для ЭПР томографии, и углерод-центрированного радикала, который атакует близлежащие биомолекулы, повреждая их структуру, создает, таким образом, окислительный стресс, губительный для паразитов и раковых клеток.

В работе представлены результаты изучения активации гомолиза алкоксиаминов при протонировании функциональных групп в нитроксильной и алкильной части. Известно, что рН среды липосом раковых клеток, сдвинут в кислую область. Таким образом, протонирование функциональных групп алкоксиаминов будет способствовать гомолизу и работе агента тераностики. Показано, что протонирование функциональных групп алкильной части алкоксиамина приводит к снижению энергии активации гомолиза, и соответственно понижению температуры гомолиза. Такой же эффект наблюдали при образовании комплексных соединений ионов металлов и алкоксиаминов.

Также известно применение алкоксиаминов в качестве инициаторов радикальной контролируемой полимеризации (РКП). Для использования алкоксиаминов в качестве пролекарства можно создать полимерный контейнер методом РКП, который будет выполнять роль агента адресной доставки. Исследована полимеризация стирола и бутилакрилата, влияние комплексообразования и протонирования на этот процесс, а также приготовление блок-сополимеров с полиэтиленгликолем. Последние могут образовывать мицеллы в

растворе и быть агентами адресной доставки. Показано, что протонирование и комплексообразование – это методы повышения эффективности РКП.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-73- 10101

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

К. В. Абанина

Сибирский федеральный университет, Красноярск, Свободный проспект 79, Россия

E-mail: ksen.aba@mail.ru

Важным аспектом для создания лекарственных носителей является выбор материала, используемого в качестве матрикса. Такой материал должен обладать рядом медико-биологических и физико-механических свойств, например, таких как биосовместимость и биodeградация [1]. Полиэфиры бактериального происхождения – полигидроксиспиртаны (ПГА), обладают высокой биосовместимостью, постепенно разрушаются в организме и, благодаря этому, появляется возможность использовать их в качестве носителей лекарственных препаратов (ЛВ), а так же контролировать выход ЛВ в окружающую среду [2]. На сегодняшний день существует множество различных методов для получения лекарственных носителей, которые позволяют получить матрикс для ЛВ, отвечающий всем необходимым механическим и физико-химическим свойствам [3].

Цель работы – конструирование полимерных микрочастиц на основе поли(3-гидроксипропирата) (П(ЗГБ)) в композиции с синтетическими полимерами, нагруженных лекарственными препаратами с использованием различных методов, а так же исследование свойств полученных микрочастиц.

Материалы и методы. Для конструирования микрочастиц использовали биосовместимый и биоразлагаемый полимер поли(3-гидроксипропират) (П(ЗГБ)) – полиэфир алкановых кислот микробиологического происхождения, а так же композитные материалы на основе П(ЗГБ) с добавлением поли(молочно-гликолиевой) кислоты (ПЛГА) и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для депонирования в полимерные микрочастицы были выбраны препараты, различающиеся по химическому строению и относящиеся к различным фармакологическим группам: противоопухолевый препарат – 5-фторурацил; антибиотик широкого спектра действия – цефтриаксон; противотуберкулезный препарат – рифампицин.

В данной работе для получения полимерных микрочастиц использовали метод испарения растворителя из трехкомпонентной эмульсии и метод распылительного высушивания, с использованием установки Mini Spray Dryer B-290 (BUCNI Laboratory Equipment, Швейцария). Размеры, размерное распределение, а так же поверхностный заряд микрочастиц (дзета-потенциал) измеряли с использованием анализатора частиц *Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания)*.

Результаты. В ходе работы была получена серия полимерных микрочастиц с использованием вышеперечисленных методов, на основе композитных материалов П(ЗГБ)/ПЛГА и П(ЗГБ)/ПЭГ с разным процентным соотношением компонентов, а именно 25:75, 50:50, 75:25. Изучены и проанализированы свойства полученных микрочастиц: размер (от $1030 \pm 29,3$ до $6966 \pm 358,2$ нм), размерное распределение и дзета-потенциал (от $-13,1 \pm 0,4$ до $-53,0 \pm 1,1$ мВт), а так же установлено влияние метода получения и состава композитного материала на выход микрочастиц, их структуру, размер. На основе

полученных данных были отобраны образцы, с оптимальными характеристиками, для дальнейшего изучения. Отработана техника депонирования лекарственных препаратов в полимерные микрочастицы. Изучено влияние химического состава препарата на эффективность депонирования в полимерные микрочастицы. Получена серия микрочастиц на основе П(ЗГБ), П(ЗГБ)/ПЛГА и П(ЗГБ)/ПЭГ, нагруженные рифампицином, цефтриаксоном и 5-фторурацилом, так же изучены свойства полученных носителей: размер (от $889,8 \pm 23,2$ до $4680 \pm 478,9$ нм), размерное распределение и дзета-потенциал (от $-9,56 \pm 0,2$ до $-49,6 \pm 1,63$ мВт).

Заключение. Таким образом, в ходе работы на основе П(ЗГБ) в композиции с синтетическими полимерами ПЛГА и ПЭГ получены микрочастицы хорошего качества, различающиеся по свойствам (размер и дзета-потенциал) и пригодные для депонирования различных по химической природе и фармакологическому спектру действия препаратов.

Литература

1. Горева, А. В. Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров оксикалкановых кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов / А. В. Горева, Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова, Э. Дж. Сински // Высокомолекулярные соединения. – 2012. – Сер. А. – Т. 54. – №2. – С. 224 – 236.
2. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая – Красноярск. Издательство «Красноярский писатель». – 2011. – 392 с.
3. Соснов, А. В. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц/ А. В. Соснов, Р. В. Иванов, К. В. Балакин, Д. Л. Шоболов, Ю. А. Федотов, Ю. М. Калмыков // Качественная клиническая практика: новые лекарственные средства и технологии.– 2008. – №2.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ И ЭСТЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ОСНОВЕ БИОРАЗРУШАЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ

Е.А. Коляда¹, А.В. Муруева²

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

²Институт биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН), Россия, 660036, Красноярск,
Академгородок, 50/50

E-mail: katia.kolyada@yandex.ru

Материалы на основе природных полиэфиров полигидроксиалканоатов (ПГА) имеют широкие перспективы применения в качестве биорезорбируемого материала для реконструктивных и эстетических технологий мягких тканей благодаря широкому спектру свойств, влияющих на сроки биорезорбции изделий различной геометрии, включая микрочастицы [1]. Для совершенствования свойств биосовместимости материала актуальна модификация поверхности полимерных микрочастиц различными соединениями, к примеру – молекулами белка.

Цель исследования – получение и изучение свойств материала, потенциально пригодного для реконструктивных и эстетических инъекционных технологий мягких тканей на основе биоразрушаемых полигидроксиалканоатов.

Материалы и методы. В работе были использованы в качестве полимеров – поли (3-гидроксibuтират (1200 кДа) и сополимер 3-гидроксibuтирата с 3-гидроксивалератом (1500

кДа) с содержанием ЗГВ 11% и П(ЗГБ) 89%. В качестве вещества, модифицирующего поверхность полимерных микрочастиц, использовали белок – бычий сывороточный альбумин (БСА) – Albumin, Bovine (BSA), производитель – Amresco.

Микрочастицы из ПГА были получены эмульсионным методом. Для увеличения количества СООН-групп в составе полимерных цепей ПГА использовали метод карбоксилирования микрочастиц. С помощью карбодиимидного метода осуществлялась модификация белком поверхности микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ). Количественное определение белка в частицах осуществляли при помощи биуретового метода. Оптическую плотность раствора определяли при 540 нм. Анализ свойств микрочастиц, то есть определение их электрокинетического потенциала или ζ -потенциала и размера проводили с помощью системы Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) и с применением сканирующей электронной микроскопии на микроскопе ТМ-3000 (Hitachi, Япония). Выход микрочастиц рассчитывали в процентах от массы использованного для их получения полимера:

$$V = \frac{D_m}{D_p} \cdot 100\%$$

где:

V – выход микрочастиц;

D_m – масса полученных микрочастиц, мг;

D_p – масса использованного полимера, мг.

Ковалентное присоединение белка к ПГА подтверждали с помощью ИК-Фурье спектроскопии на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700, производитель – Thermo Scientific (USA). Для оценки стабильности пептидной связи между СООН-группой полимерных микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) и NH_2 -группой БСА был проведен эксперимент длительностью в 4 дня при 5 видах воздействия: pH 7,4; pH 5,0; $t=37^\circ\text{C}$; $t=4^\circ\text{C}$; механическое перемешивание на магнитной мешалке при 150 об/мин. В состав исходных образцов входили следующие компоненты: 5 образцов содержали по 25 мг микрочастиц из П(ЗГБ)/БСА + 2 мл СФБ; следующие 5 образцов содержали по 23 мг микрочастиц из П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА + 2 мл СФБ. Для оценки стабильности пептидной связи 0,5 мл супернатанта каждого образца отбирались в 4-х временных повторностях: через 2 часа после воздействия; через 5 часов; через 1 день; через 4 дня. Количественное определение белка в полученном супернатанте было проведено при помощи метода Лоури. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США).

Результаты. Получены микрочастицы из 2 %-го раствора П(ЗГБ) и 2%-го раствора П(ЗГБ/ЗГВ). Измерение массы полученных микрочастиц проводили в 4 повторностях для П(ЗГБ) и для П(ЗГБ/ЗГВ). Используя полученные данные, был высчитан выход микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), который составил $75,5 \pm 9,9\%$ и $72,1 \pm 9,2\%$ от исходной массы полимера. После метода карбоксилирования выход микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) составил $92,3 \pm 5,8\%$ и $79,3 \pm 5,6\%$ от исходно взятой массы микрочастиц. Далее поверхность готовых микрочастиц была модифицирована БСА с использованием карбодиимидного метода. Измерение массы полученных микрочастиц проводили в 4 повторностях для П(ЗГБ) и для П(ЗГБ/ЗГВ). Используя полученные данные, был высчитан выход микрочастиц модифицированных БСА из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), который составил $94 \pm 1,9\%$ и $98,5 \pm 0,5\%$ от исходно взятой массы карбоксилированных микрочастиц. Была определена концентрация БСА, связанного с ПГА для модификации поверхности в микрочастицах. Для расчета концентрации, связанного с микрочастицами БСА использовали формулу:

$$K_{\text{мч}} = K_{\text{исх}} - K_{\text{с}} ;$$

Таким образом, концентрация связанного с микрочастицами из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) БСА равна $60 \pm 2,0$ и $69 \pm 2,0$ мг или $30 \pm 1,0$ % и $34,5 \pm 1,0$ % соответственно.

Среднее значение размера полученных микрочастиц для П(ЗГБ) составило $64,7 \pm 1,04$ мкм; П(ЗГБ/ЗГВ) – $73,7 \pm 2,2$ мкм; карбоксилированные П(ЗГБ) – $58,9 \pm 1,4$ мкм; карбоксилированные П(ЗГБ/ЗГВ) – $61,8 \pm 1,4$ мкм; П(ЗГБ)/БСА – $79,8 \pm 1,5$ мкм; П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА – $65,8 \pm 1,9$ мкм. Полученные данные свидетельствуют об эффективном присоединении белка к полимерным микрочастицам. Среднее значение ζ -потенциала полученных микрочастиц для П(ЗГБ) составило $-27,0 \pm 4,4$ мВ; П(ЗГБ/ЗГВ) – $-28,7 \pm 2,0$ мВ; карбоксилированные П(ЗГБ) – $-31,8 \pm 6,6$ мВ; карбоксилированные П(ЗГБ/ЗГВ) – $-42,3 \pm 12,6$ мВ; П(ЗГБ)/БСА – $-21,1 \pm 1,4$ мВ; П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА – $-26,6 \pm 1,7$ мВ. Исходя из полученных результатов, можно сказать, что значения ζ -потенциала напрямую связаны с модификацией поверхности полимерных микрочастиц.

В ходе исследования свойств полученных микрочастиц из П(ЗГБ)/БСА и П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА оценена стабильность пептидной связи БСА с COOH-группами на поверхности данных микрочастиц. По результатам количественного определения белка методом Лоури, концентрация БСА в супернатанте составила $0,0000165$ мг/мл. При этом исходное количество белка у микрочастиц из П(ЗГБ)/БСА и П(ЗГБ/ЗГВ)/БСА составило $7,96$ мг/мл и $7,95$ мг/мл. Таким образом, белок был обнаружен в следовых количествах во всех опытных образцах, что свидетельствует о высокой стабильности пептидной связи у полученных микрочастиц. Для оценки стабильности пептидной связи были оценены такие параметры как: размер микрочастиц и ζ -потенциал. Показано, что наибольшее влияние на стабильность белковой связи оказывают повышение температуры и механическое воздействие.

Заключение. В ходе выполнения работы получены микрочастицы из растворов П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), которые после карбоксилирования и модификации поверхности белком (БСА) характеризуются хорошими показателями (выход микрочастиц, размер, ζ -потенциал, количественное содержание белка) и высокой стабильностью пептидной связи.

Литература

1. Шишацкая, Е.И. Биodeградация ПГА *in vivo* / Е.И. Шишацкая // Journal of Siberian Federal University. – 2016. – Т. 1, № 9. – С. 21–32.

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

А.В. Владимирова, А.М. Шершнева

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

E-mail: Aleksa-vladimirova@yandex.ru

Одним из приоритетов в развитии современной медицины и фармакологии является создание новых высокоэффективных лекарственных систем [1]. Адресные системы доставки препаратов обладают многочисленными преимуществами по сравнению с обычными лекарственными формами. Связывание фармакологически активного компонента с биополимерной матрицей и постепенное выведение из нее позволяет обеспечить длительное поддержание требуемой концентрации активного лекарственного средства в организме или локально в конкретном органе. Такой механизм устраняет необходимость в дополнительном повторном введении препарата, повышает его эффективность, снижает побочные эффекты

лекарств, представляет возможности для локализованного направленного действия лекарственного средства, стоимость лечения снижается [2]. Ключевым моментом в создании микроносителей лекарственных препаратов является набор оптимальных физико-химических и поверхностных характеристик носителя, таких как размер, форма, пористость и поверхностный заряд, а также эффективность инкапсулирования.

Цель работы – создание микросферических носителей биологически активных веществ (БАВ) в виде микрочастиц на основе полигидроксиалканоатов и изучение их характеристик.

Материалы и методы. Использованы два типа полимеров из семейства полигидроксиалканоатов (ПГА): в качестве полимеров – поли(3-гидроксибутират) (1200 кДа) и сополимер 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (1500 кДа) с содержанием мономеров П(ЗГБ)/ЗГВ=89/11 мол.%. В качестве лекарственных препаратов для инкапсулирования в полимерные микрочастицы использовали антисептики для местного применения – бриллиантовый зеленый, мирамистин, фурацилин. Микрочастицы из ПГА были получены с помощью эмульсионного метода. Инкапсулирование выбранных лекарственных препаратов было осуществлено с использованием метода испарения растворителя из трехкомпонентной эмульсии. Был проведен анализ характеристик полученных микрочастиц. Электрокинетический потенциал (дзета-потенциал) был измерен на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS («Malvern», Великобритания). Величину включения лекарственных препаратов в полимерную матрицу определяли спектрофотометрированием по его исходной и остаточной концентрации в эмульсии при излучении на длине волны 625 нм (бриллиантовый зеленый), 260 нм (мирамистин), 365 нм (фурацилин), на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Выход микрочастиц рассчитывали в процентах от массы использованного для их получения полимера:

$$V = \frac{D_m}{D_p} \cdot 100\%;$$

где:

V – выход микрочастиц;

D_m – масса полученных микрочастиц, мг;

D_p – масса использованного полимера, мг.

Эффективность инкапсулирования (ЕЕ) препарата в полимерной матрице рассчитывали по формуле:

$$EE = \frac{W_{total} - W_{free}}{W_{total}} \cdot 100\%$$

где:

W_{total} – исходная масса препарата, мг;

W_{free} – масса препарата, не включенная в полимерную матрицу, мг.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США).

Результаты. В ходе работы получены микрочастицы из 2%-го раствора П(ЗГБ) и 2%-го раствора П(ЗГБ/ЗГВ), и исследованы их функциональные характеристики.

Измерение массы полученных микрочастиц проводили в 4 повторностях для П(ЗГБ) и для П(ЗГБ/ЗГВ). Используя полученные данные, был высчитан выход микрочастиц из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), который составил 92,0% и 94,5% от исходной массы полимера.

Среднее значение размера полученных микрочастиц для П(ЗГБ) составило $63,56 \pm 1,67$ мкм; П(ЗГБ) + бриллиантовый зеленый – $61,25 \pm 0,66$ мкм; П(ЗГБ) + Мирамистин – $5,64 \pm 0,17$; П(ЗГБ) + Фурацилин – $94,81 \pm 2,40$; П(ЗГБ/ЗГВ) – $70,80 \pm 1,73$ мкм; П(ЗГБ/ЗГВ) +

бриллиантовый зеленый – $58,86 \pm 1,34$ мкм; П(ЗГБ/ЗГВ) + Мирамистин – $37,14 \pm 3,59$ мкм; П(ЗГБ/ЗГВ) + Фурацилин – $45,73 \pm 0,08$ мкм.

Среднее значение ζ -потенциала полученных микрочастиц для П(ЗГБ) составило – $19,2 \pm 0,95$ мВ; П(ЗГБ) + бриллиантовый зеленый – $-27,3 \pm 1,90$ мВ; П(ЗГБ) + Мирамистин – $-0,8 \pm 0,40$ мВ; П(ЗГБ) + Фурацилин – $-0,8 \pm 0,40$ мВ; П(ЗГБ/ЗГВ) – $-27,5 \pm 0,95$ мВ; П(ЗГБ/ЗГВ) + бриллиантовый зеленый – $-27,5 \pm 0,95$ мВ; П(ЗГБ/ЗГВ) + Мирамистин – $-27,5 \pm 0,95$ мВ; П(ЗГБ/ЗГВ) + Фурацилин – $-27,5 \pm 0,95$ мВ.

Полученные данные свидетельствуют об относительной стабильности частиц обоих составов без включения препаратов, а также частиц, нагруженных бриллиантовым зеленым и Фурацилином. Частицы с Мирамистином по полученным значениям относятся к очень маленьким по размерам и нестабильным. Возможно, этот эффект обусловлен особенностями смешивания препарата с материалом-матриксом.

Заключение. Эмульсионным методом получены микрочастицы из 2%-го раствора П(ЗГБ) и 2%-го раствора П(ЗГБ/ЗГВ), нагруженные лекарственными препаратами, которые обладают хорошими функциональными характеристиками, включая выход частиц, размер, ζ -потенциал.

Литература

1. Бонарцев, А. П. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // Бонарцев А. П., Яковлев С. Г., Филатова Е.В. [и др.]. – Биомедицинская химия. – 2011. – № 57, вып. 2. – С. 232-240.
2. Singh, M.N. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery // Singh M.N., K.S.Y. Hemant, M. Ram, H.G. Shivakumar. – Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. – 2010.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ДЕПОНИРОВАННЫХ В П(ЗГБ) МИКРОЧАСТИЦЫ

А.М. Шершнева¹, А.В. Муруева²

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

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

E-mail: sheranna@inbox.ru

Конструирование долговременных систем доставки лекарственных препаратов относится к числу важнейших направлений современной биотехнологии и фармакологии. Разработка таких систем с регулируемым высвобождением терапевтических агентов позволяет быстро достигать лечебного эффекта и поддерживать уровень требуемой терапевтической концентрации в течение длительного времени, а их использование дает возможность уменьшить курсовую дозу, устранить негативное воздействие и передозировку лекарственных веществ, уменьшить частоту проявлений побочных эффектов.

Цель работы – разработка долговременных лекарственных форм антибактериальных препаратов на основе поли-3-гидроксибутирата, и исследование их эффективности действия в отношении бактерий *in vitro*.

Материалы и методы. Объектом исследования служил высокоочищенный образец гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)). В качестве лекарственных препаратов были выбраны Доксициклин (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь) и Цефтриаксон (ЗАО «Лекко», Россия) из-за широкого антибактериального спектра их действия.

Микрочастицы на основе П(ЗГБ), нагруженные антибиотиками 1, 5 и 10% от массы полимера, были получены эмульсионным методом. Антибактериальную активность сконструированных П(ЗГБ) микрочастиц определяли с использованием диско-диффузионного метода на колониях клеток *Escherichia coli*, *Pseudomonas species* и *Staphylococcus aureus*. В качестве контроля использовали коммерческие диски антибактериальных препаратов доксициклина и цефтриаксона (с содержанием 30 мкг препарата, «BioRad», Франция), а также коммерческие препараты в дозе, соответствующей содержанию в микрочастицах.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам использовали инокулят, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту McFarland и содержащий порядка $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Инокуляцию проводили стерильными ватными тампонами равномерными штриховыми движениями. Спустя 15 минут посередине чашки Петри проделывали лунки диаметром 0,5 мм и раскапывали в них экспериментальные образцы (по 20 мг на лунку) в физиологическом растворе в объеме, не превышающем 100 мкл. Аппликацию дисков проводили без формирования лунок с помощью стерильного пинцета. По окончании чашки Петри оставляли в термостате при 37°C. Спустя сутки измеряли диаметр зон задержки роста культуры.

Результаты. Было проведено две серии экспериментов: в первой была исследована антибактериальная активность микрочастиц, нагруженных цефтриаксоном. Наиболее выраженный антибактериальный эффект разработанных форм был характерен в отношении *E.coli*. Так, для коммерческого диск (концентрация препарата 30 мкг) зона задержки роста *E.coli* составила 37 мм, для *Pseudomonas spp.* – 20 мм и для *S.aureus* – 26 мм.

Несмотря на то, что культуре клеток *E.coli* свойственна выработка β -лактамазы расширенного спектра действия, которая инактивирует β -лактамы антибиотиков, включая цефтриаксон, в отношении данной культуры была зафиксирована эффективная задержка роста культуры в зависимости от используемой концентрации. Так, с увеличением нагрузки цефтриаксона от 1 до 10% в микрочастицах был характерен рост зон ингибирования колоний от 32,5 до 41,5 мм, соответственно.

При исследовании лекарственной эффективности инкапсулированной формы цефтриаксона в культурах клеток *Pseudomonas spp.* и *S. aureus* также была выявлена тенденция к увеличению зон задержки роста при увеличении концентрации препарата содержащегося в микрочастицах. Стоит отметить, что действие цефтриаксона направлено на ингибирование синтеза клеточной стенки, а именно на разрушение поперечной сшивки пептидогликанов. Однако, несмотря на то, что грамположительные культуры имеют более плотный пептидогликановый слой, в отношении *S.aureus* был отмечен лучший антибактериальный эффект по сравнению с *Pseudomonas spp.*, что скорее всего связано с чувствительностью клеток к данному препарату.

В качестве контроля также была проверена активность П(ЗГБ) микрочастиц, ненагруженных препаратом, и физиологического раствора, используемого для суспендирования микрочастиц. В обоих случаях ингибирования роста анализируемых культур не наблюдалось.

Таким образом, проведенные исследования в первой серии опытов подтвердили лекарственную эффективность и пролонгированное действие разработанных инкапсулированных форм цефтриаксона.

Во второй серии опытов была исследована антибактериальная активность микрочастиц, нагруженных доксициклином в отношении культур *E.coli* и *S.aureus*. Активность инкапсулированной формы доксициклина в отношении *Pseudomonas spp.* не рассматривалась, так как данная культура является устойчивой к воздействию данного антибиотика.

Зона задержки роста в контрольной группе с коммерческим диском для *S.aureus* составила 28 мм, для *E.coli* – 20 мм. В отличие от цефтриаксона механизм действия доксициклина направлен на подавление синтеза белка бактерий. В данном случае наиболее эффективное действие инкапсулированной формы доксициклина было характерно для грамположительных клеток *S.aureus*. Стоит отметить, что ингибирующий эффект инкапсулированного доксициклина по отношению к грамотрицательной культуре *E.coli* имел слабый характер во всех выбранных концентрациях. Так, зона задержки роста не превысила 15,5 мм, что ниже допустимого диапазона чувствительности (18-24 мм) согласно МУК 42.1890-04 [1]. При этом свободная форма данного препарата в аналогичной концентрации эффективно ингибировала рост культуры.

Заключение. Показано, что с увеличением количества препарата в микрочастицах размер зон ингибирования бактериальных культур возрастал. Это свидетельствует о том, что сконструированные лекарственные формы позволяют антибактериальному препарату эффективно диффундировать в среду. Кроме того, установлено, что свободная форма антибактериальных препаратов во всех анализируемых группах эффективнее подавляла рост бактерий по сравнению с инкапсулированной формой, что подтверждает пролонгированное действие разработанных форм. В целом, кроме инкапсулированного доксициклина в отношении *E.coli*, можно сделать вывод, что разработанные лекарственные формы антибиотиков на основе П(ЗГБ) обладают хорошей антибактериальной активностью в отношении анализируемых культур.

Литература

МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОЧАСТИЦ ИЗ НИЗКО- И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

А.И. Калуцкая

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

Современный уровень развития медицинской науки располагает к широкому внедрению высокомолекулярных соединений, включая полиэферы, синтезируемые живыми системами. Наиболее перспективными полимерами в последнее десятилетие, вместе с полилактидами и полигликолидами, считаются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэферы алкановых кислот микробного происхождения [1].

Полигидроксиалканоаты, ПГА, являются перспективными биоразрушаемыми материалами для различных применений в биомедицине, так как они не токсичны и биологически совместимы [2]. Для разных целей требуются материалы с определенными технологическими характеристиками, которые определяются качественным составом мономеров и молекулярной массой. Возможность модифицировать структуру и регулировать молекулярную массу ПГА природного происхождения открывает более широкие возможности для получения микро- и наноразмерных частиц-носителей для целей современной фармакологии, для депонирования и доставки препаратов.

Цель работы – отработка способов получения микро- и наночастиц из образцов поли-3-гидроксibuтирата различной молекулярной массы.

Материалы и методы. Исследовали высокоочищенные образцы ПГА: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты [П(ЗГБ)] с исходной средневесовой молекулярной массой (M_v) 1500 кДа, синтезированный в лаборатории «Биотехнологии новых материалов» СФУ. В качестве деполимеризующих агентов использованы борогидрид натрия ($NaBH_4$) и гидроксид натрия ($NaOH$). Деполимеризацию при помощи $NaBH_4$ осуществляли в растворе полимера в хлороформе в течение 3 и 48 часов и с помощью обработки полимера $NaOH$ при времени воздействия от 15 до 60 минут. Для снижения молекулярной массы полимера применяли метод термической дегградации (нагрев образцов до 190 °С). Микрочастицы получены из 1%-го раствора П(ЗГБ) с применением метода одноэтапного эмульгирования.

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гелепроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_v) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($PD = M_v/M_n$).

Результаты. Показано, что деполимеризацию П(ЗГБ) можно проводить с использованием физических и химических агентов (таблица).

Обработка полимера борогидридом натрия привела к снижению молекулярной массы полимера на 99,5 % от исходной массы в течение первых трех часов обработки. Наибольшее падение молекулярной массы П(ЗГБ) зарегистрировано в образцах, обработанных $NaBH_4$ в течение 3 и 48 ч, а также в образце, подвергшемся термической обработке в течение 30 минут (до 99,3%).

Таблица – Молекулярно-массовое распределение образцов полимера после термической обработки (образец 1, 2 и 3), и после обработки $NaBH_4$ (образец 4 и 5), изменение свойств микрочастиц из этих образцов – дзета-потенциал

П(ЗГБ)	Время обработки	Молекулярная масса, Да			Средний Диаметр частиц, нм	Дзета-потенциал, мВ
		M_v	M_n	PD		
Исходный образец	-	1479500	615810	2,40	923,9±14,71	-16,2±0,49
1	10 мин	26523	2371	1,10	667,8±1,51	-18,3±1,04
2	20 мин	11411	2097	5,42	693,8±14,04	-16,3±0,6
3	30 мин	9845	1977	4,99	597,6±38,51	-15,7±0,4
4	3 ч	7987	2207	3,62	754,9±24,82	-21,5±0,85
5	48 ч	6499	2009	3,05	624,8±9,91	-21,3±0,3

Обработка полимера $NaOH$ при различном времени воздействия (от 15 до 60 минут) показала снижение молекулярной массы на 82 % от исходной. Это свидетельствует о менее эффективном способе дегградации, по сравнению с методом боратной реакции и термической обработкой полимера.

В ходе данной работы методом термической дегградации, боратной реакции и с помощью обработки полимера щелочью получены образцы низкомолекулярного полимера со значением молекулярной массы от 6 499 до 280 000 Да.

На основе полученных образцов низкомолекулярного полимера с применением метода испарения растворителя получены микрочастицы. Были использованы образцы низкомолекулярных полимеров после обработки NaBH_4 в течение 3 и 48 ч с молекулярной массой 6 499 и 7 987 Да соответственно. Также были использованы образцы, подвергавшиеся термическому воздействию с молекулярной массой в диапазоне от 9 845 до 26 523 Да.

В таблице показано, что средний диаметр микрочастиц из всех образцов низкомолекулярного полимера находится в одном размерном диапазоне от $597,6 \pm 38,51$ нм до $754,9 \pm 24,82$, что связано с близкими значениями молекулярной массы образцов. Важно отметить, что при использовании высокомолекулярного полимера, размер микрочастиц достоверно выше, их диаметр составил $923,9 \pm 14,71$ нм.

Закключение. Установлено, что можно значительно снижать молекулярную массу ПГА с применением различных физических и химических агентов и получать микрочастицы различного диаметра. С применением метода одноэтапного эмульгирования были получены микрочастицы хорошего качества из образцов П(ЗГБ) со сниженной молекулярной массой.

Литература

1. Шершнева, А.М. Конструирование микрочастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки / А.М. Шершнева, Е.И. Шишацкая // Journal of Siberian Federal University. Biology 2 – Красноярск, 2014. – Т. 2, № 7. – С. 195–208.
2. Hazer, D. Burchu Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review / D. Hazer Burcu et al. // Journal of Materials Science and Engineering: C. – 2012. – v. 32, p. 637–647.

THE INTERACTION OF CELLS WITH BIOMATERIAL SURFACES

Vasif Hasirci^{1,2}

¹Middle East Technical University (METU), Department of Biological Sciences and

²BIOMATEN, METU CoE in Biomaterials and Tissue Engineering, Ankara, Turkey

E-mail: vhasirci@metu.edu.tr

Biomaterials field started mainly with pure materials such as ceramics, metals and polymers. The biocompatibility of these devices was important and tests to ensure their compatibility were developed. Eventually, the investigation of surface properties and the interaction of surfaces with the tissues began. With the introduction of tissue engineering concept this notion became more important. Since tissue engineering takes on the task of preparation of tissue substitutes the tissue-material interaction became a very important issue. The confocal micrograph below shows an engineered blood vessel using photolithography to create the main theme of the vasculature on a surface regionally covered by cell attractive polymers over a cell repellent polymeric surface followed by seeding of endothelial cells. The making of this quite satisfactory vasculature was a result contribution from a number different fields including cell biology, materials science and polymer chemistry along with cell culture techniques, histochemical and various microscopic techniques. In this presentation examples from a number of different studies for constructing a variety of tissue mimics will be provided.

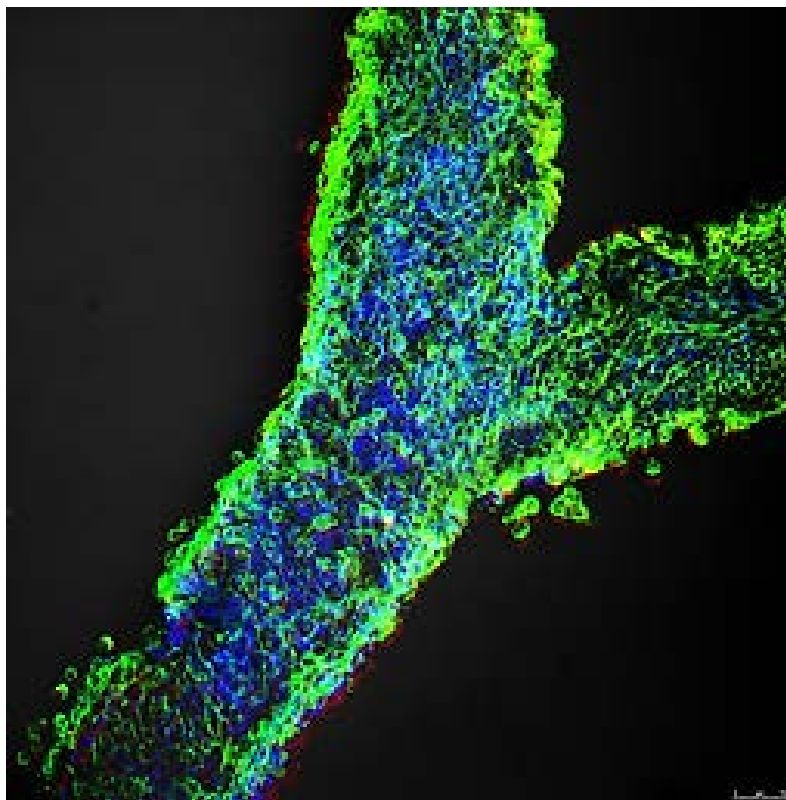


Figure – Confocal laser scanning microscopy image of HUVEC cells on ColMA modified MeHA hydrogel on Day 10. (Stained for the actin filaments and the nuclei) [1]

References

1. Komez et al. J. Biomed. Mater. Res Pt A, 2016.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ СУБСТРАТА НА ПОВЕДЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Е.Д. Николаева

*Институт биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН), 660036, Россия, Красноярск,
Академгородок, 50, стр. 50*

E-mail: nikolaeva-lena@mail.ru

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки – это частично дифференцированные стволовые клетки, способность к дифференцировке которых ограничена пределами одного зародышевого листка. ММСК впервые были выделены из костного мозга, и в настоящее время обнаружены во многих тканях организма. Сейчас наиболее безопасным для пациента источником ММСК считается жировая ткань, где концентрация ММСК достигает 2×10^5 /г жировой ткани [1].

ММСК являются предшественниками ряда тканей, чаще всего дифференцировка идет по остеогенному, хондрогенному и адипогенному типу, однако несколько групп ученых провели дифференцировку по нейрогенному, эндотелиальному и эпителиальному типам [2].

Известно, что на дифференцировку стволовых клеток влияет совокупность окружающих их факторов: наличие определенных питательных веществ, ростовых факторов и цитокинов, субстрат, наличие кислорода, pH, давление, концентрация Ca^{2+} , а также взаимодействие с другими стволовыми и дифференцированными клетками [3]. Одним из факторов, регулирующих дифференцировку, является структура и состав субстрата, к которому клетки прикрепляются.

Цель работы – оценка дифференцировки ММСК жировой ткани по дермальному и остеогенному типу на различных видах матриксов из полигидроксиалканоатов и бактериальной целлюлозы.

Материалы и методы. Использованы полупроницаемые мембраны, полученные электростатическим формованием из сополимерных полимеров (ПГА) и композитные матриксы из ПГА и бактериальной целлюлозы. ММСК получены из висцеральной жировой ткани крыс линии Вистар ферментативным методом. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением раствора антибиотиков и 10% эмбриональной телячьей сыворотки в 5% атмосфере CO₂ при 37 °С. Для дифференцировки клеток добавляли смесь соответствующих факторов дифференцировки. Для засева матриксов использовали клетки 3-4 пассажей. Культивирование клеток на матриксах проводили в течение 2-3 недель, после чего клетки с матриксов снимали трипсином и экстрагировали мРНК фенольным методом. Методом PCR-RT в режиме реального времени определяли транскрипцию генов коллагена I типа (один из маркерных белков фибробластов дермы), кератинов 10 и 14 (соответствуют клеткам базального слоя и шиповатого слоя эпидермиса), а также BMP-2 (костный морфогенетический белок, регулирует формирование остеобластов).

Результаты. Показано, что все исследованные матриксы поддерживали адгезию и рост клеток, однако добавление факторов дифференцировки снижало жизнеспособность клеток на матриксах. Более успешно дифференцировка протекала в дермальном и остеогенном направлении. При культивировании ММСК в среде ДМЕМ с добавлением сыворотки клетки на всех матриксах активно синтезировали межклеточное вещество с высоким содержанием коллагена. Остеогенная дифференцировка также была подтверждена в реакции PCR-RT и при окрашивании антителами к остеопонтину, причем наиболее активно на более рельефной поверхности. Дифференцировка в эпидермальном направлении протекала наименее эффективно.

Литература

1. Baer P.C., Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity / P.C. Baer and H. Geiger // Stem Cells International. – 2012. – V. 2012. – 11 p.
2. Петренко А.Ю. Стволовые клетки жировой ткани / А.Ю. Петренко, Э.Н. Иванов, Ю.А. Петренко // БИОТЕХНОЛОГИЯ. – 2008. – Т.1. – № 4. – С. 39-48.
3. Пинаев Г.П. Ниши стволовых клеток / Г.П. Пинаев // Вопросы морфологии XXI века. – 2011. – Т.4. – С. 54-57.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГРАФТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕТКАНЫХ МЕМБРАН ИЗ СОПОЛИМЕРОВ П(ЗГБ/4ГБ)

Л. М. Двойнина¹, Е.Д. Николаева²

¹*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50*

E-mail: nikolaeva-lena@mail.ru

Для конструирования тканеинженерных систем (графтов) использованы нетканые мембраны, сформированные неориентированными волокнами из растворов сополимера П(ЗГБ/4ГБ) 2-6 вес.%, методом электростатического формования при величине

электрического поля в диапазоне 25 кВ. Использование вращающегося барабана (1000 об/мин) обеспечило получение ориентированных УВ, свойства которых отличны от неориентированных. Мембраны из ориентированных имели более высокими значениями механической прочности, показателями которой служили модуль Юнга и абсолютная разрывная нагрузка, значения которых на порядок превосходили таковые у неориентированных мембран (рис. 1).

ММСК жировой ткани крысы, прекультивирование которых на специализированной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и раствора антибиотиков обеспечило дифференцировку в фибробласты. Клетки активно синтезировали коллаген 1-го типа, что подтверждено методом ПЦР в режиме «реального времени» в комбинации с методом обратной транскрипции в области количественной оценки экспрессии генов к факторам коллагена 1-го типа (Col-1) (рис. 2).

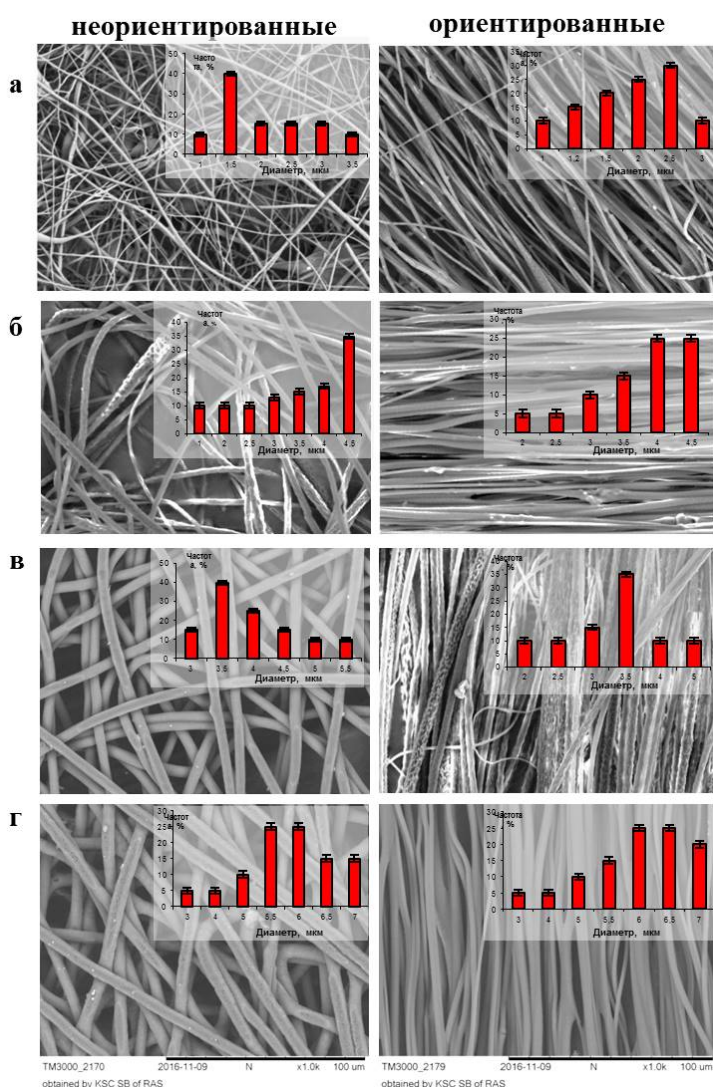


Рисунок 1 – РЭМ снимки нетканых мембран, сформированных из неориентированных и ориентированных ультратонких волокон методом ЭСФ из растворов П(ЗГБ/4ГБ) различной концентрации: а, б – 2%-ный раствор; в, г – 8%-ный раствор

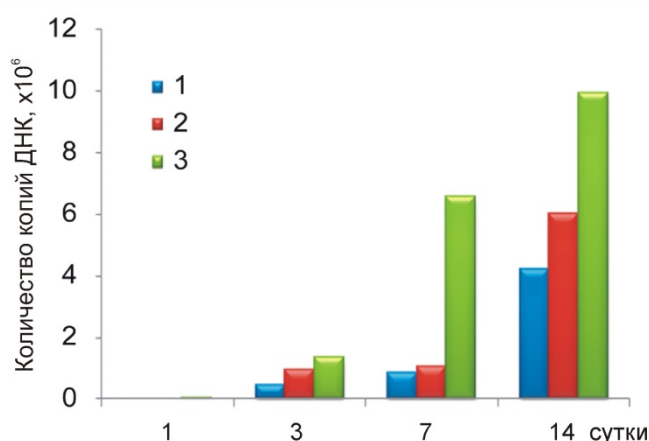


Рисунок 2 – Результаты количественного определения экспрессии кДНК коллагена I типа (результаты нормализованы относительно housekeeping gene – β -актина): 1 – контроль (клетки на полистироле), 2 – ориентированная П(ЗГБ/4ГБ) мембрана, 3 – неориентированная П(ЗГБ/4ГБ) мембрана

Чистота культуры подтверждена выполненной ПЦР на эндотелиальные маркеры CD31 и CD34; доля клеток, несущих CD31 и CD34, не превышала 2 %. В серии пассажей получена культура фибробластов, которой заседали мембраны из П(ЗГБ/4ГБ) (содержание мономеров 4ГБ составило 10 мол.%). Окрашивание культивируемых клеток с помощью антител к виментину (маркер синтетической активности фибробластов) показало, что клетки на обоих типах мембран синтезировали виментин – структурный белок мезодермальных клеток соединительной ткани, в т.ч. фибробластов. Экспрессия белка теплового шока (HSP47) и пролил-4-гидроксилазы (фермент, участвующий в синтезе коллагена) также подтвердили у клеток фенотип фибробластов (рис. 3).

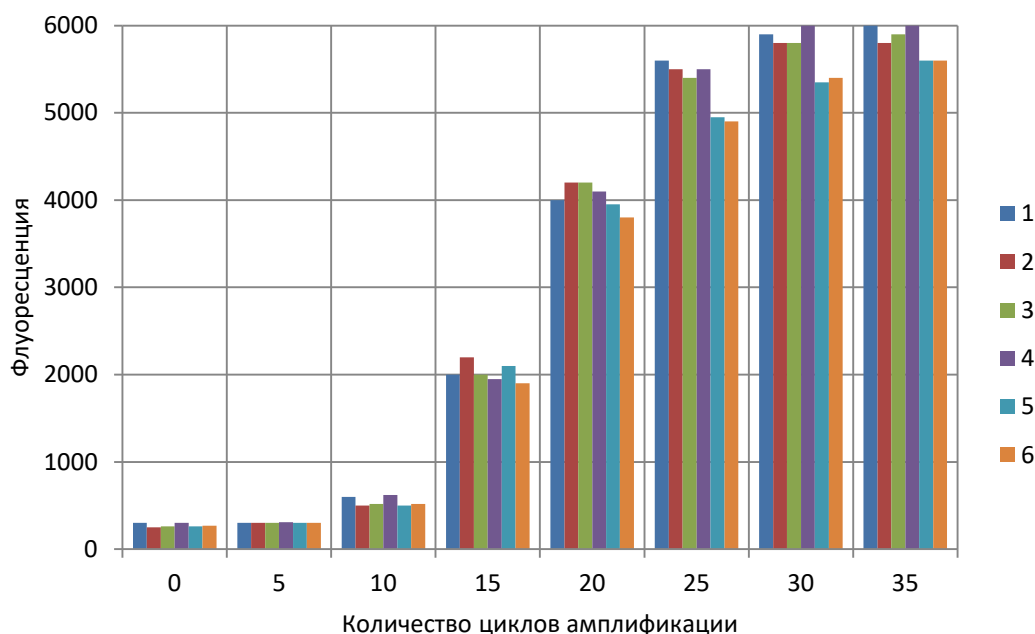


Рисунок 3 – Экспрессия в культуре ММСК белков теплового шока HSP47 и пролил-4-гидроксилазы, культивируемых на мембранах из П(ЗГБ/4ГБ) с разной ориентацией волокон: 1 – контроль HSP47 (первичные фибробласты), 2 – экспрессия HSP47 в ММСК на ориентированных волокнах, 3 – экспрессия HSP47 в ММСК на неориентированных волокнах, 4 – экспрессия пролил-4-гидроксилазы в ММСК на ориентированных волокнах, 5 – экспрессия пролил-4-гидроксилазы в ММСК на неориентированных волокнах

Окрашивание по Ван-Гизону показало продукцию белков соединительной ткани (коллаген); формирование которого зафиксировано на всех образцах, но наиболее активно на мембранах из неориентированных волокон. Результаты иммуноцитохимического окрашивания антителами к коллагену 1-го типа подтвердили более интенсивный синтез коллагена в клетках, растущих на нетканых мембранах из сополимера по сравнению с контролем.

Заключение. Сконструированные графты, представляющие собой нетканые мембраны из П(ЗГБ/4ГБ), полученные методом ЭСФ, несущие пролиферирующие фибробласты, активно синтезируют белки соединительной ткани и пригодны для тканевой инженерии.

Acknowledgments

The reported study was funded by RFBR and Government of Krasnoyarsk Territory according to the research project № 16-43-242024

РЕОЛОГИЯ РАСТВОРОВ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

А.Г. Суковатый¹, Д.Б. Гончаров²

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50*

²*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79*

E-mail: a.sukovaty@ya.ru

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биodeградируемые и биосовместимые линейные полиэфиры микробиологического происхождения, являются перспективным материалом для изготовления изделий, пригодных для применения в различных сферах. Важным технологическим свойством ПГА является возможность переработки общепринятыми методами (испарением растворителя, техникой микроинкапсулирования, холодного прессования порошков, прессованием и экструзией расплавов) из различных фазовых состояний (растворов, эмульсий, порошков, расплавов). Разнообразные изделия из ПГА (пленки, мембраны, микрогранулы и микрочастицы), предназначенные для депонирования и доставки биологически активных соединений и лекарственных средств, препаратов для защиты культурных растений от сорняков, вредителей и возбудителей болезней культурных растений, могут быть получены из растворов этих полимеров. Для получения специализированных полимерных изделий из растворов необходимы знания основных реологических свойств таких полимерных систем. Наиболее значимым параметром растворов служит динамическая вязкость, который определяет физические характеристики процесса разделения фаз в растворах полимеров разных типов, а это, в свою очередь, определяет выбор реагентов для растворения полимеров различного химического строения. Сведения о вязкости полимерных растворов в целом необходимы для формирования фундаментальных представлений о взаимодействии полимеров с различными растворителями. Относительно ПГА, информация о реологии растворов полимеров этого семейства весьма ограничена.

Цель исследования – изучение зависимости динамической вязкости растворов полигидроксиалканоатов различного химического строения, полученных с использованием различных растворителей.

Материалы и методы. В работе использовали образцы ПГА различного химического строения и свойств, синтезированные в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН: гополимер 3-гидроксibuтирата [П(ЗГБ)], сополимеры

П(ЗГБ) с 3-гидроксивлаератом (ЗГВ); 3-гидроксигексаноатом (ЗГГ), 4-гидроксибутиратом (ГБ). Полимерные растворы образцов полигидроксиалканоатов различного химического состава с концентрациями (С, %) от 1 вес. % до 10 вес. % были изготовлены с использованием хлороформа и дихлорметана. Динамическая вязкость была измерена при изменении температуры от 5 °С до 60 °С для хлороформа, и от 5 °С до 40 °С для дихлорметана, с шагом изменения температуры 5 °С.

Полученные результаты представлены на рисунке. Для всех растворов ПГА в хлороформе выявлено увеличение значений динамической вязкости с повышением концентрации полимера в растворе. При этом самые высокие значения показателя зафиксированы при температуре 5 °С у 2%-х и 5%-х растворов П(ЗГБ) на уровне 200 и 2200 сП соответственно. Снижение вязкости характерно для более текучих растворов сополимера П(ЗГБ/ЗГВ). Так, при содержании мономеров ЗГВ 10,5 мол.%, зарегистрировано более чем пятикратное снижение исследуемого параметра по сравнению с аналогичными по концентрации растворами П(ЗГБ). Низкие показатели вязкости зафиксированы для сополимера П(ЗГБ/4ГБ), на уровне 3 и 30 сП при 5 °С, соответственно, у 2%-х и 5%-х растворов.

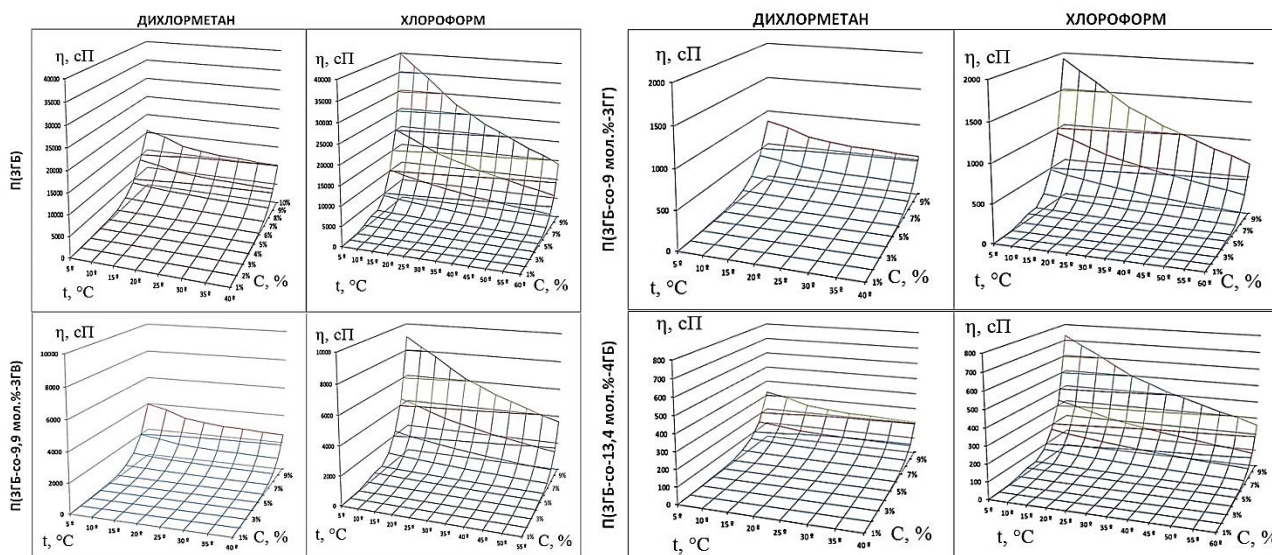


Рисунок – Зависимость динамической вязкости полимерных растворов полигидроксиалканоатов различного химического в дихлорметане и хлороформе состава от температуры и концентрации раствора

Аналогичные измерения проведены для растворов ПГА в дихлорметане. Этот растворитель предпочтительное, т. к. относится в 4-му классу опасности и разрешен в медицине в отличие от хлороформа, отнесенного ко 2-му классу опасности. Полученные значения динамической вязкости для этого растворителя значительно ниже по сравнению с вязкостью аналогичных полимерных растворов, приготовленных с использованием хлороформа. Максимальные значения динамической вязкости также зафиксированы для растворов гомополимера П(ЗГБ). Так, у 2-х и 5%-х растворов при самой низкой температуре (5 °С) значения составили, соответственно, 50 и 450 сП. При содержании в сополимере П(ЗГБ/ЗГВ) мономеров ЗГВ до 10 мол.%, так же, как и в случае применения в качестве растворителя хлороформа, сопровождалось более чем пятикратным снижением показателя по сравнению с аналогичными растворами П(ЗГБ), соответственно, 10 и 95 сП при 5 °С, и 10 и 70 сП при комнатной температуре. Вязкость растворов П(ЗГБ/4ГБ) с массовой долей мономеров 4ГБ 10 мол.% была наименьшей и составила минимально 0,8 и 42 сП при 5 °С;

несколько выше при комнатной температуре (соответственно, 0,5 и 45 сП), и минимально при 40 °С 0,5 и 4,2 сП.

Заключение. Исследована реология растворов ПГА различного химического строения в хлороформе и дихлорметане и установлены зависимости динамической вязкости от химического состава ПГА, плотности полимерных растворов и температуры среды. Растворы ПГА по убыванию величины динамической вязкости можно расположить в следующем порядке: П(ЗГБ) – П(ЗГБ-ЗГВ) – П(ЗГБ-ЗГГ) – П(ЗГБ-4ГБ). Динамическая вязкость растворов ПГА в хлороформе в 3–3,5 раза выше, чем у растворов на основе дихлорметана. Полученные результаты позволяют получать растворы ПГА с различными реологическими характеристиками, что важно для получения полимерных изделий растворными технологиями.

СВОЙСТВА НЕТКАНЫХ МЕДИЗДЕЛИЙ ИЗ РЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ МОНОКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ФОРМОВАНИЯ

А.Г. Суковатый¹, Д.Б. Гончаров²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50

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

E-mail: a.sukovatiy@ya.ru

Электростатическое формование (ЭСФ) является современным способом получения нетканых изделий, сформированных ультратонкими волокнами. К его достоинствам можно отнести относительную простоту, низкую стоимость, высокую скорость производства, широкий выбор используемых материалов и универсальность. Метод ЭСФ позволяет контролировать диаметр получаемых волокон и микроструктуру нетканых изделий, изготавливаемых на их основе. Возможность объединения различных полимеров в процессе формования позволяет создавать нетканые материалы с широким диапазоном свойств для различных применений. Еще один подход для улучшения качества нетканых изделий заключается в использовании различных способов собственно процесса электростатического формования. Самыми универсальным способом ЭСФ является формирование нетканых изделий с использованием одного подающего капилляра и, соответственно, одного полимерного раствора, который может включать в себя два и более типа полимеров. При этом компоненты полимерного раствора равномерно распределены в структуре волокон нетканого изделия. Второй способ основан на использовании двух и более подающих капилляров на один собирающий коллектор, что позволяет изготавливать мембраны с волокнами из разных полимеров, распределенных в пространственной структуре мембраны. Оба способа позволяют модифицировать свойства нетканого материала, к которым можно отнести физико-механические характеристики, структуру и свойства поверхности.

Цель работы – получение и сравнительное изучение нетканых изделий, полученных из полимеров монокарбонных кислот при различных способах электростатического формования.

Объекты и методы. Использовали растворы поли-3-гидроксибутирата (П(ЗГБ)), полилактида (ПЛА), полигликолида (ПГ) и сополимера поли(лактид-гликолида) (ПЛГ) с равным содержанием компонентов. П(ЗГБ) синтезирован в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН (Россия); ПЛА и ПГ фирмы Sigma Aldrich Co. Германия, поли(лактид-гликолид) фирмы Across Organics (США). ЭСФ осуществляли с

помощью автоматизированной установки Nanop 01A (MECC Inc., Япония). Схемы процесса ЭСФ с использованием одного и двух подающих капилляров (для двух разных полимерных растворов, одновременно) представлены на рис. 1.

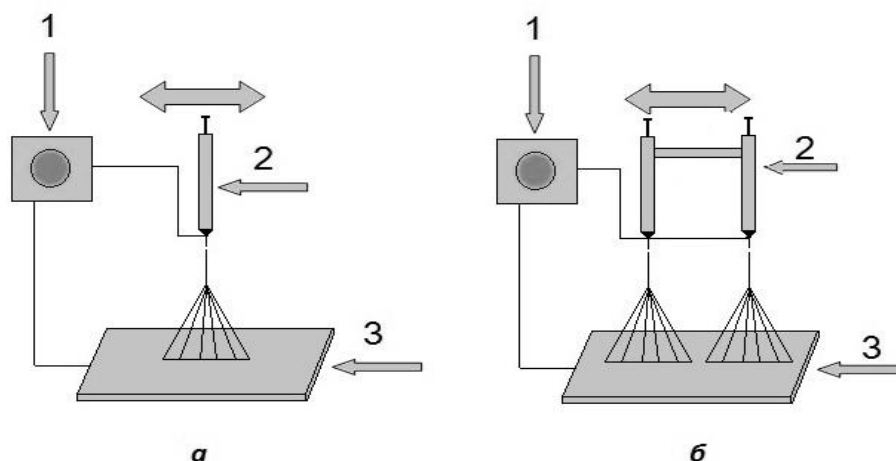


Рисунок 1 – Схема процесса электростатического формования с использованием: а – одного подающего капилляра; б – двух подающих капилляров (из двух разных полимерных растворов, одновременно) на один собирающий коллектор (1 – источник высокого напряжения; 2 – шприцевой насос; 3 – собирающий коллектор)

Результаты. Для всех типов полимеров были получены ультратонкие волокна с равномерной, гладкой структурой поверхности без видимых дефектов в виде бус (рис. 2).

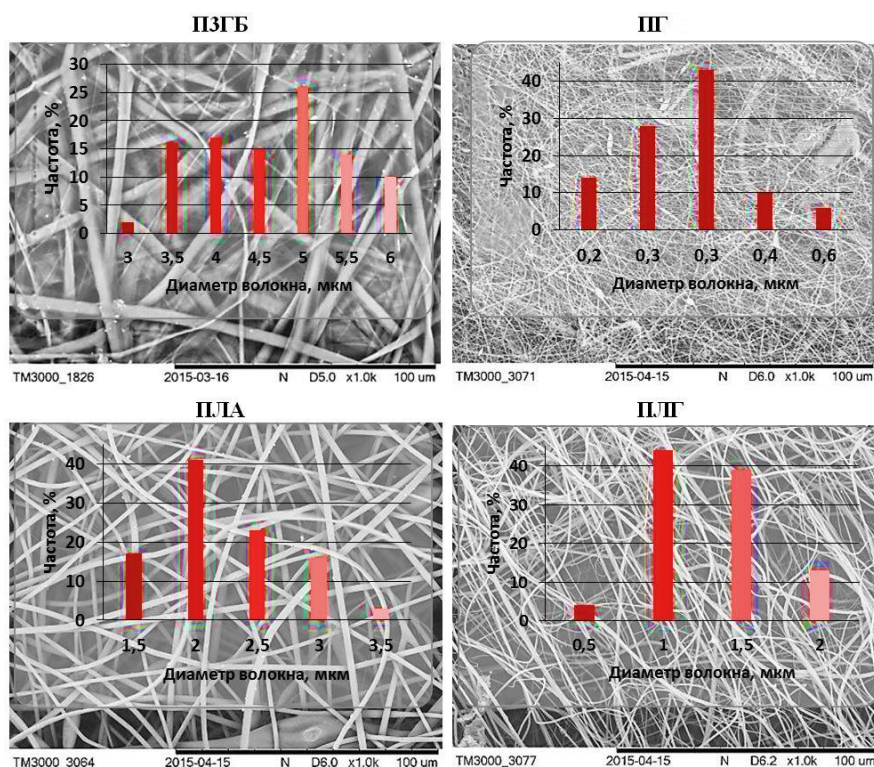


Рисунок 2 – РЭМ изображения нетканых изделий и распределение диаметра волокон, образованных из поли-3-гидроксibuтирата, полилактида, полигликолида и сополимера поли(лактид-гликолида)

Анализ результатов измерений диаметра волокон для различных типов полимеров показал явную зависимость этого параметра от типа полимера при одинаковых параметрах процесса электростатического формования. Самые высокие значения диаметра волокон были получены для П(ЗГБ), где максимальное значение составляло 6,0 мкм, а средний диаметр – 4,5 мкм. Самые низкие величины диаметра волокон были зафиксированы у образцов нетканых изделий из чистого полигликолида, у которых максимальный диаметр волокон не превышал 6 мкм, а среднее значение составляло 3 мкм.

Результаты исследования влияния способа ЭСФ на морфологию и свойства нетканых изделий показаны на рис. 3, на котором видно, что при использовании двух подающих капилляров при формировании нетканого изделия происходит пространственное распределение по слоям волокон, имеющим различную химическую структуру.

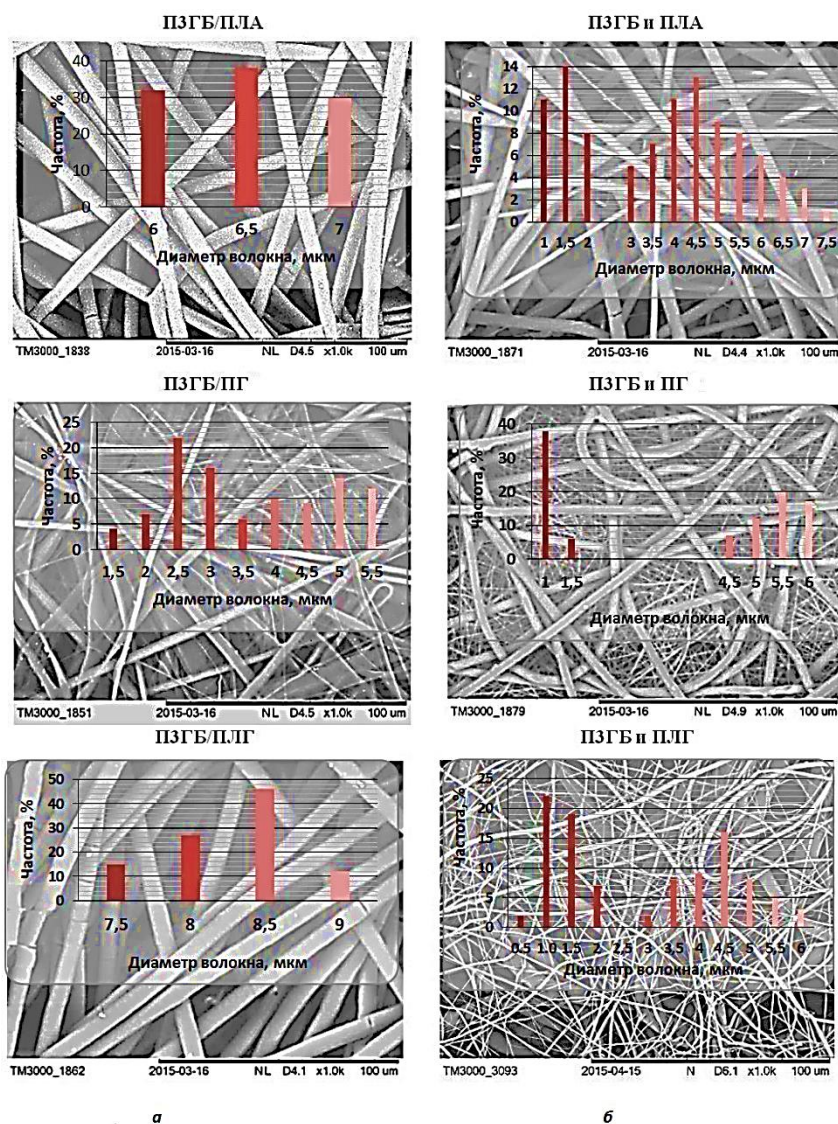


Рисунок 3 – РЭМ изображения нетканых изделий и распределение диаметра волокон из поли-3-гидроксibuтирата, полилактида, полигликолида и сополимера поли(лактид-гликолида), полученных с использованием: а – одного подающего капилляра; б – двух подающих капилляров на один собирающий коллектор

Образцы, сформированные из П(ЗГБ) и ПЛА, в одном слое содержали волокна различных диаметров (1,5 мкм и 4,5 мкм). Нетканые изделия, сформированные из П(ЗГБ) и ПГ, имели чёткое пространственное разграничение по диаметру волокон, по разным полимерным слоям. Величины среднего диаметра волокон составляли 1,0 мкм и 5,5 мкм. Образец с составом П(ЗГБ) и ПЛГ имел похожую слоистую структуру мембраны, как

нетканое изделие, полученное из П(ЗГБ) и ПГ. Средние диаметры волокон составляли 1,0 мкм и 4,5 мкм.

Заключение. Методом электростатического формования с использованием одного подающего капилляра и двух подающих капилляров на один собирающий коллектор получены нетканые изделия из растворов полимеров поли-3-гидроксibuтирата, полилактида и полигликолида и сополимера поли(лактид-гликолида), их смесей и исследованы их характеристики. Показано, что при использовании двух подающих капилляров при формировании нетканого изделия происходит пространственное распределение по слоям волокон, имеющим различную химическую структуру. Для физико-механических характеристик нетканых изделий обнаружена прямая зависимость эластичности нетканого изделия от состава полимерного раствора и обратная для механической прочности от способа электростатического формования.

ПОВЕРХНОСТНАЯ И СТРУКТУРНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОСОВМЕСТИМОСТИ ИЗДЕЛИЙ

А.Н. Бояндин¹, А.Г. Суковатый¹, В.А. Бессонова², Л.М. Двойнина², Д.В. Сапего²

¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, 660036, Академгородок, 50/50

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, пр. Свободный, 79

E-mail: araneus@mail.ru

Среди преимуществ биосинтетических и химически синтезируемых полиэфиров моногидроксимоникарбоновых кислот (полигидроксиалканоев, ПГА), – высокая биосовместимость, биоразрушаемость, термопластичные свойства, хорошие возможности управления физико-механическими характеристиками за счет варьирования химического состава. В то же время для ПГА характерны сравнительно высокая гидрофобность поверхности, жесткость и хрупкость наиболее доступных представителей этого класса полимеров, относительно низкая проницаемость для жидкостей и газов, что ограничивает их применение. Для улучшения физико-механических и биологических свойств ПГА возможны такие подходы, как получение их смесей с другими биополимерами, изменение микроструктуры поверхности введением порообразователей, обработка химическими реагентами, а также химическая модификация полимерных цепей.

Материалы и методы. Поли-3-гидроксibuтират (П(ЗГБ)) и сополимер поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат (8 мол.% 3-гидроксивалерата) (П(ЗГБ/ЗГВ)) были получены микробным биосинтезом с использованием штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 в различных режимах культивирования, выделены и очищены пересадкой в систему «хлороформ-гексан». Поли-ε-капролактон ($M_w=169$ кДа, ПД=1.86) приобретался у фирмы Sigma-Aldrich. Остальные реагенты приобретались уровня чистоты «ч.д.а.» или выше у различных производителей.

Пленки получали методом испарения из растворов, разливая 2%-ные растворы полимеров (П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ), ПКЛ, смеси П(ЗГБ)/ПКЛ и П(ЗГБ/ЗГВ)/ПКЛ) в хлороформе в чашки Петри по 20 мл. Для получения пористых пленок растворы полимеров (П(ЗГБ), ПКЛ, смесь П(ЗГБ)/ПКЛ при соотношении компонентов 1:3) с известной концентрацией камфоры разливали в чашки Петри по 20 мл. Удаление камфоры осуществляли последовательной четырехкратной отмывкой изопропиловым спиртом.

Для модификации поверхности пленки подвергались однократной обработке растворами химических реагентов (окислителей (H_2O_2), восстановителей ($NaBH_4$, $LiAlH_4$),

гидролитических агентов (водно-спиртовой раствор NaOH с различной концентрацией этанола, HNO_3 , H_2SO_4), аминов), либо последовательной обработке растворами LiAlH_4 , бромлирующих агентов (4-бромбутирилхлорид, бромная вода) и третичными аминами.

Для исследования закономерностей высокотемпературной деградации П(ЗГБ) использовали его растворы в высококипящих полярных (N,N-диметилформамид) и неполярных растворителях (бромформ, 1,1,2,2-тетрабромэтан, 1,2,3-трихлорпропан, диоксан), в том числе с внесением дополнительных реагентов (бифункциональные амины, замещённые карбоновые кислоты). Для получения смесей типа «высокомолекулярный полимер – функционализированный олигомер» использована техника смешения растворов высокомолекулярного П(ЗГБ) и низкомолекулярного аминированного П(ЗГБ) с последующим формированием пленок методом испарения растворителя. Биосовместимость пленок на основе ПГА исследовали методом МТТ-теста с использованием фибробластов мыши линии NIH 3T3.

Результаты. Смешение поли-3-гидроксibuтирата (П(ЗГБ)), а также его сополимера с 3-гидроксивалератом, с поли-ε-капролактоном (ПКЛ) позволило получить материал с более высокой эластичностью, чем у любого из индивидуальных компонентов (наибольшие значения удлинения на разрыв были получены для пленок, содержащих 5-25% ПГА), при сохранении сопоставимых или более высоких значениях механической прочности и биосовместимости, оцениваемой в тестах с использованием фибробластов мыши линии NIH 3T3. Введение в полимерные пленки на основе П(ЗГБ), ПКЛ и их смеси (при соотношении компонентов 1:3) камфоры в качестве порообразователя, с ее последующим выщелачиванием, обеспечило получение биосовместимых полимерных пленок с различным уровнем пористости и паропроницаемости, при умеренном снижении прочности относительно непористых пленок.

Обработка пленок из П(ЗГБ) химическими реагентами позволила получить образцы с высокими значениями гидрофильности (так, полярная составляющая свободной поверхностной энергии увеличилась с 2 до 12-19 мН/м², в зависимости от условий обработки). Оценка скорости пролиферации фибробластов в МТТ-тесте показала увеличение биосовместимости у образцов, обработанных NaOH, LiAlH_4 и этилендиамином, а также подвергнутых последовательной обработке с участием триэтиламина и триэтаноламина.

Исследование закономерностей расщепления высокомолекулярного П(ЗГБ), в зависимости от температуры, растворителя, наличия реагентов позволило получить олигомеры с различной молекулярной массой (от тысяч до десятков тысяч Да), в том числе содержащих бром и аминогруппы на терминальных концах полимерной цепи. Смешение аминированных олигомеров (средневесовая молекулярная масса 4-6 кДа) с высокомолекулярным интактным П(ЗГБ) позволило получить образцы, обладающие повышенной биосовместимостью при сохранении приемлемых физико-механических свойств.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о применимости разработанных методов для улучшения физических характеристик и биосовместимости материалов на основе полиэфиров гидроксикарбоновых кислот для их использования в качестве носителей для тканевой инженерии.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ

Бондарь В.С.

*Институт биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН), 660036, Россия, Красноярск,
Академгородок, 50, стр. 50
E-mail: bondvs@mail.ru*

Развитие современной нанотехнологии направлено на создание научно-методической базы для применения наноматериалов разной физико-химической природы в разработке и создании новых эффективных средств решения широкого спектра задач в области биологии, медицины, фармакологии, экологии, токсикологии, и т.д. Прогнозируется, что использование наноматериалов в данных областях будет способствовать их выходу на новый качественный уровень и увеличит эффективность используемых в этих сферах методов. Предполагаются значительные достижения в разработке и создании: эффективных технологий сепарации и выделения биомолекул в диагностических и научных целях; высокочувствительных систем индикации и диагностики; средств нейтрализации токсикантов; маркерных материалов для визуализации биообъектов; средств управления регенераторными процессами; систем избирательной или управляемой доставки лекарств к очагам патологии.

Исследователи, изучающие возможности и варианты биомедицинского применения наноматериалов, проявляют неослабевающий интерес к использованию в этих целях разных наночастиц углерода, в частности, к наноалмазам детонационного синтеза – одному из наиболее перспективных материалов этой группы. Физико-химические свойства алмазных наночастиц (химически полиморфная, активная поверхность, возможности ее химической модификации, малая токсичность и высокая биосовместимость) позволяют рассматривать их как наноматериал биотехнологического и биомедицинского назначения.

В докладе обобщаются результаты многолетних исследований сотрудников ИБФ СО РАН (Красноярск, Россия), изучающих физико-химические свойства наноалмазов взрывного синтеза и их применимость в разработке и создании новых технологий и методов биолого-медицинского назначения. Приводятся данные приоритетного характера, которые развивают представления о функциональных возможностях наноалмазов. Одним из наиболее значимых результатов отмечается получение модифицированных наноалмазов с высокой коллоидной стабильностью в разных дисперсионных средах, что открыло возможности разноплановых исследований применимости этих наночастиц в биомедицинских приложениях. Приводятся примеры использования модифицированных наноалмазов в экспресс-технологиях сепарации и выделения белков; конструировании систем индикации, биохимической диагностики и адресной доставки биоактивных субстанций; разработке технологий экстракорпорального гемодиализа и плазмафереза; создании средств связывания и нейтрализации токсических соединений.

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ КАК НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Е.Д. Посохина¹, Н.О. Ронжин², А.В. Барон^{1,2}, В.С. Бондарь²

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

²Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

E-mail: katerina.p.93@mail.ru

Одно из актуальных направлений современной биотехнологии связано с созданием новых эффективных систем индикации и диагностики для биомедицинской аналитики. К наиболее перспективным аналитическим средствам относятся системы, конструируемые посредством иммобилизации ферментов на разных типах носителей. Преимуществами таких систем являются высокая избирательность и чувствительность при детекции аналитов, относительная простота и быстрота проведения анализа.

При создании аналитических систем биомедицинского назначения часто используют пероксидазы. Например, эти ферменты широко применяют в клинических лабораториях для определения в биологических жидкостях физиологически важных веществ (глюкоза, холестерин, триглицериды) [1] и диагностики ряда заболеваний [2].

В качестве подложки (носителя) для иммобилизации ферментов интерес могут представлять полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры жирных кислот бактериального происхождения [3]. ПГА обладают рядом ценных свойств для производства разных изделий биомедицинского назначения [3]. Однако химическая инертность и гидрофобные свойства ПГА могут сужать спектр их биомедицинских приложений и, в частности, ограничивать возможности применения как носителей при создании систем индикации и диагностики с использованием ферментов.

Цель работы – оценка применимости изделий из ПГА для иммобилизации ферментов.

Материалы и методы. В экспериментах использованы пероксидаза хрена (Sigma, США) и два типа изделий (пластины и стержни) из поли-3-гидроксibuтирата П(ЗГБ), полученных в ИБФ СО РАН (Красноярск). Иммобилизацию фермента осуществляли его адсорбцией или ковалентной пришивкой на подложку. При ковалентной пришивке поверхность полимера предварительно обрабатывали бензохиноном. Методика обработки носителя бензохиноном и последующей ковалентной пришивки ферментов изложена нами ранее [4]. Активность иммобилизованного фермента оценивали с помощью реакции окислительного азосочетания (H_2O_2 – 4-аминоантипирин – фенол) по образованию цветного продукта [5]. Реакцию проводили в реакционной смеси, содержащей пероксид водорода, 4-аминоантипирин и фенол и инициировали, инкубируя в объеме реакционной смеси подложку с иммобилизованным ферментом. Количество образовавшегося продукта реакции определяли спектральным анализом (спектрофотометр UV-1800, Shimadzu, Япония) инкубационной среды после проведения реакции азосочетания. Оценку проводили по величине оптической плотности среды при длине волны 506 нм. При многократном использовании комплексов подложка-фермент каждый раз после проведения реакции их промывали деионизованной водой для удаления остатков компонентов реакции и цветного продукта.

Результаты. Установлено, что в обоих случаях после иммобилизации пероксидазы на изучаемые типы подложек из П(ЗГБ) фермент проявлял каталитическую активность и обеспечивал образование цветного продукта в реакции азосочетания. Однако было показано, что большей эффективностью обладают комплексы, полученные при ковалентной пришивке фермента на пластинчатые подложки полимера. Как следует из полученных данных (Рис. 1), фермент, иммобилизованный на подложках, проявляет каталитическую активность при

многократном использовании. Наблюдаемое снижение выхода цветного продукта в ходе многократного использования комплекса П(ЗГБ)-пероксидаза, вероятно, может быть связано с частичной десорбцией фермента с поверхности подложки (в случае его адсорбции) или постепенной инактивацией фермента (в случае его ковалентной пришивки) продуктом реакции, который может адсорбироваться на носителе и ингибировать фермент. Выяснение причин наблюдаемого эффекта требует дальнейшего изучения.

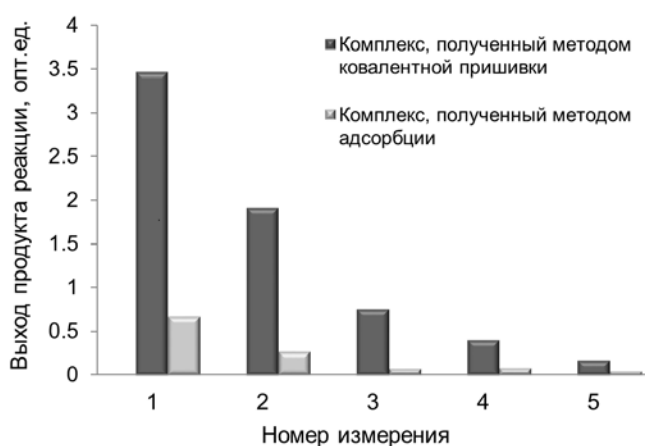


Рисунок 1 – Выход продукта реакции азосочетания при многократном использовании комплексов П(ЗГБ)-пероксидаза, полученных с помощью адсорбции и ковалентной пришивки фермента на поверхность полимера

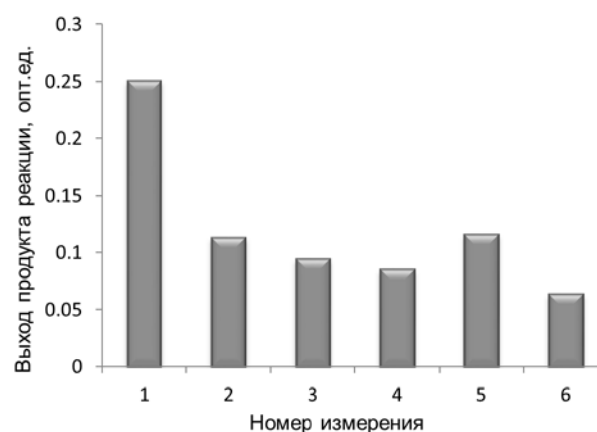


Рисунок 2 – Выход продукта реакции азосочетания при многократном использовании комплекса П(ЗГБ)-пероксидаза после ковалентной пришивки фермента на обработанную пероксидом водорода подложку полимера

В дополнительных исследованиях было показано, что обработка подложек полимера озоном и пероксидом водорода не приводит к увеличению количества иммобилизованного фермента. В пользу этого свидетельствуют данные (рис. 2) существенно меньшего выхода цветного продукта реакции азосочетания при многократном использовании комплекса П(ЗГБ)-пероксидаза, полученного после ковалентной пришивки фермента на обработанную пероксидом водорода подложку.

Заключение. Установлена возможность иммобилизации пероксидазы на разные типы подложек из П(ЗГБ)с помощью адсорбции и ковалентной пришивки. В обоих случаях иммобилизованный фермент проявляет активность и катализирует образование цветного продукта в реакции окислительного азосочетания. Показано, что большей эффективностью обладают комплексы, полученные при ковалентной пришивке фермента на пластинчатые подложки из П(ЗГБ)-полимера. Оптимизация условий иммобилизации фермента (ферментов) на ПГА-носителях для увеличения эффективности и стабильности получаемых комплексов является предметом дальнейших исследований.

Литература

1. Menezes F.G., Neves A.C.O., Lima D.F., Lourenco S.D., Silva L.C., Lima K.M.G. Bioorganic concepts involved in the determination of glucose, cholesterol and triglycerides in plasma using the enzymatic colorimetric method // *Quimica Nova*. 2015. V.38. P. 588–594.
2. Давыдова Г.В., Ермаков О.А., Панасенко А.И., Тищенко А.М. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза // *Химия растительного сырья*. 1998. №1. С.15–18.
3. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J. Degradable polymers: production, properties and applications. New York: Nova Science Publ. Inc., 2013. 380 p.

4. Ronzhin N.O., Baron A.V., Mamaeva E.S., Puzyr A.P., Bondar V.S. Nanodiamond-based tests systems for biochemical determination of glucose and cholesterol // J. Biomat. Nanobiotech. 2013. V.4. P.242-246.

5. Еремин А.Н., Семашко Т.В., Михайлова Р.В. Соокисление фенола и 4-аминоантипирина, катализируемое полимерами и сополимерами пероксидазы корня хрена и глюкозооксидазы *Penicillium funiculosum* 46.1 // ПБиМ. 2006. Т.42. С.452–461.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НАНОАЛМАЗОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Е.В. Инжеваткин¹, А.В. Барон^{2,3}, Н.Г. Максимов⁴, М.Б. Волкова³, А.П. Пузырь²,
В.С. Бондарь²

¹МНЦИЭСО ФИЦ КНЦ СО РАН, ²ИБФ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН,
³Сибирский федеральный университет, ⁴ИХХТ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН

E-mail: inscience@mail.ru

Одним из актуальных направлений современной нанотехнологии является создание на основе нанобъектов разной физико-химической природы новых материалов и методов биомедицинского назначения. Предполагается, что создаваемые нанобъекты медицинского применения будут вводиться в организм пациента в качестве: самостоятельных лечебных или диагностических средств, препаратов для нейтрализации токсических соединений, носителей для целевой или управляемой доставки лекарственных субстанций. Очевидно, что после выполнения своей функции нанобъекты должны либо подвергаться биодеструкции в условиях биологической среды организма, либо элиминироваться из организма, если они не подвергаются биodeградации. В связи с этим, возникает необходимость изучения вопросов распределения небiodeградируемых нанобъектов в организме, их накопления в органах и тканях и связанных с этим биологических эффектов, возможностей последующей элиминации. Изучение закономерностей межорганного распределения введенных в организм нанобъектов имеет также важное прогностическое значение для предварительной оценки их эффективности в случае локализованных патологий.

Следует сказать, что исследователи, разрабатывающие новые наноматериалы медико-биологического назначения, проявляют большой интерес к использованию в этих целях наночастиц углерода (фуллерены, нанотрубки, графен) [1-3]. Одним из перспективных материалов данной группы являются наноалмазы детонационного синтеза [4, 5]. Физико-химические свойства этих наночастиц (химически активная поверхность, возможности ее химической модификации, малая токсичность, и т.д.) свидетельствуют в пользу их применимости в биотехнологических и биомедицинских целях. В ИБФ СО РАН разработана технология получения из наноалмазов взрывного синтеза модифицированных наноалмазов (МНА) [6, 7]. МНА обладают высокой коллоидной стабильностью в разных дисперсионных средах (вода, органические растворители, масла), что открыло возможности их применения в биомедицинских исследованиях [8, 9]. Наноалмазы (в том числе МНА) имеют парамагнитные центры [10, 11], что создает предпосылки применения метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) для детекции этих наночастиц в биологических тканях.

Цель работы – изучение методом ЭПР распределения МНА в организме экспериментальных животных после внутривенного введения.

Материалы и методы. В работе использованы МНА со средним размером кластеров в водных суспензиях $d_{50} = 70.6$ нм. Гидрозо́ль МНА вводили в хвостовую вену мышам ICR

(самцы весом 26-28 г) в дозе 40 мг наночастиц/кг массы. Через 2.5 часа мышей усыпляли эфирным наркозом и брали кровь из подключичной артерии. После этого животных умерщвляли и брали для исследований печень, почки, легкие, сердце, головной мозг и мышцы бедра. Для исключения контаминации биоматериалов частицами металлов, которые могут вносить дополнительные сигналы в ЭПР-спектр образцов, все манипуляции с органами проводили с помощью пластиковых и керамических инструментов. Органы гомогенизировали, гомогенаты и кровь замораживали в жидком азоте и исследовали с помощью ЭПР Фурье-спектрометра Elexsys E580 (Bruker, Германия). Содержание наночастиц в образцах оценивали по интенсивности характерного ЭПР сигнала ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс), который пропорционален концентрации МНА в биоматериале [12].

Результаты. Установлено, что через 2.5 часа после внутривенной инъекции большее количество МНА регистрируется методом ЭПР в легких и печени животных. Расчеты, проведенные из величин характерных ЭПР сигналов, показывают, что в легких и печени мышей через 2.5 часа аккумулируется до 24% и 18% наночастиц, соответственно, от суммарной дозы введенных МНА. В то же время, в сердце и почках выявляется значительно меньшее (на 1–1.5 порядка) количество наночастиц. Наличие МНА в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра в пределах чувствительности использованного метода не выявлено. В пользу значительно большей эффективности накопления МНА в легочной ткани мышей, по сравнению с тканями других изучаемых органов свидетельствуют расчеты содержания наночастиц на единицу массы органа. Из них следует, что в легочной ткани МНА аккумулируются почти на порядок эффективнее, чем в ткани печени.

Полученные результаты открывают перспективы использования метода ЭПР в изучении динамики межорганного распределения и элиминации МНА после их внутривенного введения в организм животных.

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

Литература

1. Bakry R., Vallant R.M., Najam-ul-Haq M., Rainer M., Szabo Z., Huck C.W., Bonn G.K. Medicinal applications of fullerenes // Int. J. Nanomed. 2007. V.2 P.639-649.
2. Lamanna G., Battigelli A., Menard-Moyon C., Bianco A. Multifunctionalized carbon nanotubes as advanced multimodal nanomaterials for biomedical applications. Nanotech. Rev. 2012. V.1. P.17-29.
3. Artiles M., Rout C.S., Fisher T.S. Grafen-based hybrid materials and devices for biosensing. Adv. Drug Deliv. Rev. 2011. V.63. P.1352-1360.
4. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications. Crit. Rev. Solid State Mater. Sci. 2009. V.34. P.18-74.
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. Бондарь В.С., Пузырь А.П. Наноалмазы для биологических исследований // ФТТ. 2004. Т.46. С.698-701.
7. Пузырь А.П., Бондарь В.С. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью. Пат. РФ № 2252192 // Бюл. 2005. № 14.
8. Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Nanodiamonds with novel properties: a biological study. Diam. Relat. Mater. 2007. V.16. P.2124-2128.
9. Медведева Н.Н., Жуков Е.Л., Инжеваткин Е.В., Беззаботнов В.Е. Изучение противоопухолевых свойств модифицированных наноалмазов детонационного синтеза и

сорбированного на них доксорубина на примере асцитной карциномы Эрлиха // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т.160. С.360-363.

10. 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.

11. 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.

12. Инжеваткин Е.В., Барон А.В., Максимов Н.Г., Волкова М.Б., Пузырь А.П., Бондарь В.С. Использование ЭПР-спектроскопии для детекции наноалмазов в биологических образцах // Сборник материалов VI Всероссийская конференция по наноматериалам с элементами научной школы для молодежи «НАНО 2016». М.: ИМЕТ РАН, 2016. С.524-525.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК-АПТАМЕРА 15ТВА К ТРОМБИНУ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Р.В. Морячков^{1,2}, В.А. Спиридонова³, В.Н. Заблуда¹, Г.С. Петерс⁴

¹*Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН), Красноярск, 660036, Академгородок, 50, Россия*

²*Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, пр. Свободный, 79, Россия*

³*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозёрского, МГУ, Москва, 119992, Ленинские горы, дом 1, стр. 40, Россия*

⁴*ИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182, пл. Ак. Курчатова, 1, Россия*

E-mail: romanautilus@gmail.com

Актуальное направление таргетной медицины, разработка и реализация методов доставки терапевтических агентов в заданное место в организме: орган, ткань, или даже к конкретному белку или вирусу. Для этого используются аптамеры (греч. aptus – подходящий) – компактные цепочки ДНК или РНК (30-100 оснований) с определённой последовательностью нуклеотидов. Аптамеры отсеиваются из огромной библиотеки олигонуклеотидов (10^{12} - 10^{15} последовательностей) так, чтобы в отобранной группе из нескольких десятков различных молекул оставались те, что имеют самую высокую специфичность – степень узнавания конкретного белка или другой целевой молекулы, и аффинность – силу связывания с биомолекулой. Для понимания процессов взаимодействия нуклеиновых кислот и белков необходимо знать их третичную структуру – пространственную конформацию молекулы, которую сложно восстановить из первичной последовательности, или вычисленной вторичной структуры. Чтобы выяснить пространственную структуру биомолекул, используются различные физические методы, самый распространённый – рентгеноструктурный анализ (РСА). Но у данного метода имеются недостатки: необходимо выращивать кристалл, что уже может исказить структуру молекулы; для кристаллизации необходимо большое количество вещества, а синтез биомолекул, тем более белков – довольно дорогая процедура; аптамеры не поддаются кристаллизации по отдельности, а только в комплексе с белком. Для решения проблемы использован метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), который позволяет получать информацию о форме электронной оболочки всей молекулы прямо в растворе со

сравнительно небольшими концентрациями. Метод опробован на молекулах ДНК-аптамеров к белку тромбину.

Цель работы – исследование третичной структуры ДНК-аптамера 15ТВА к тромбину. Необходимо провести эксперимент методом МУРР с аптамером, получить конформационные параметры: размер молекулы, радиус инерции, вычислить функцию распределения по расстояниям между рассеивающими центрами молекулы. По полученным данным необходимо получить модель пространственной структуры молекулы, сравнить с данными РСА.

Материалы и методы. ДНК-аптамер 15ТВА (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') представляет собой короткий 15-звенный олигонуклеотид, который был синтезирован ещё в 1992 году [1]. Короткая цепочка ДНК сворачивается в так называемую G-квадруплексную структуру, образованную из двух гуаниновых тетрад, которые находятся в почти параллельных плоскостях, фиксируемых ионом K^+ . Именно третичная структура аптамера обеспечивает его специфичность к белку тромбину. Аптамер синтезирован в компании “Синтол” (г. Москва), подготовлен объём образца около 20 мкл с концентрацией аптамера 7,2 мг/мл в растворе буфера 10 мМ Tris-HCl с 5мМ KCl. Раствор помещён в кварцевый капилляр толщиной 1 мм и длиной около 5 см., заполняя не весь объём капилляра, а только ту часть, сквозь которую будет проходить рентгеновский пучок.

Эксперимент МУРР проведён на станции ДИКСИ в НИЦ “Курчатовский институт”. Синхротронное излучение с помощью монохроматора отсекается до одной длины волны $\lambda=0,162$ нм, затем коллиматорами формируется узкий пучок (0,3x0,2 мм) рентгеновского излучения. На первом этапе была проведена калибровка коллиматоров и детектора Pilatus 1М с помощью рассеяния на порошке AgBh. Далее был проведён эксперимент на капилляре с раствором без образца. После этого капилляр с образцом был помещён под пучок синхротронного рентгеновского монохроматического излучения и проведён эксперимент МУРР на самом образце в растворе. Экспозиции на обоих измерениях длились по 300 сек. с током пучка около 138 мА. Далее из сигнала от образца в буфере был вычтен сигнал от буфера и таким образом получен сигнал от образца отдельно.

Результаты. В ходе эксперимента была получена зависимость интенсивности рассеянного на образце рентгеновского излучения от угла рассеяния, выраженного в обратных нанометрах. Анализ и обработка полученных результатов были проведены в программном пакете ATSAS для работы с данными малоуглового рассеяния.

График МУРР представлен на рис. 1, А. По кривой рассеяния определено, что концентрация аптамера подобрана почти оптимально, лишь слегка заметно проявление межчастичной интерференции в виде “горба” на графике в районе $s=1$ нм⁻¹, поэтому начальную часть графика пришлось отбросить. Анализ Гинье при этом показал довольно линейный характер кривой на малых углах зависимости $\log(I)$ от s^2 (рис. 1, В). Это свидетельствует о хорошем качестве образца. Также вычислен радиус инерции $R_g=1,04$ нм [2] как тангенс угла наклона линейной аппроксимации.

Оценена конформация аптамера с помощью графика Кратки (рис. 1, С) [3]. Форма графика в виде колокола, спадающего до начальных значений на больших углах, позволяет сказать, что молекула 15ТВА имеет компактную свёрнутую структуру, близкую к сферической.

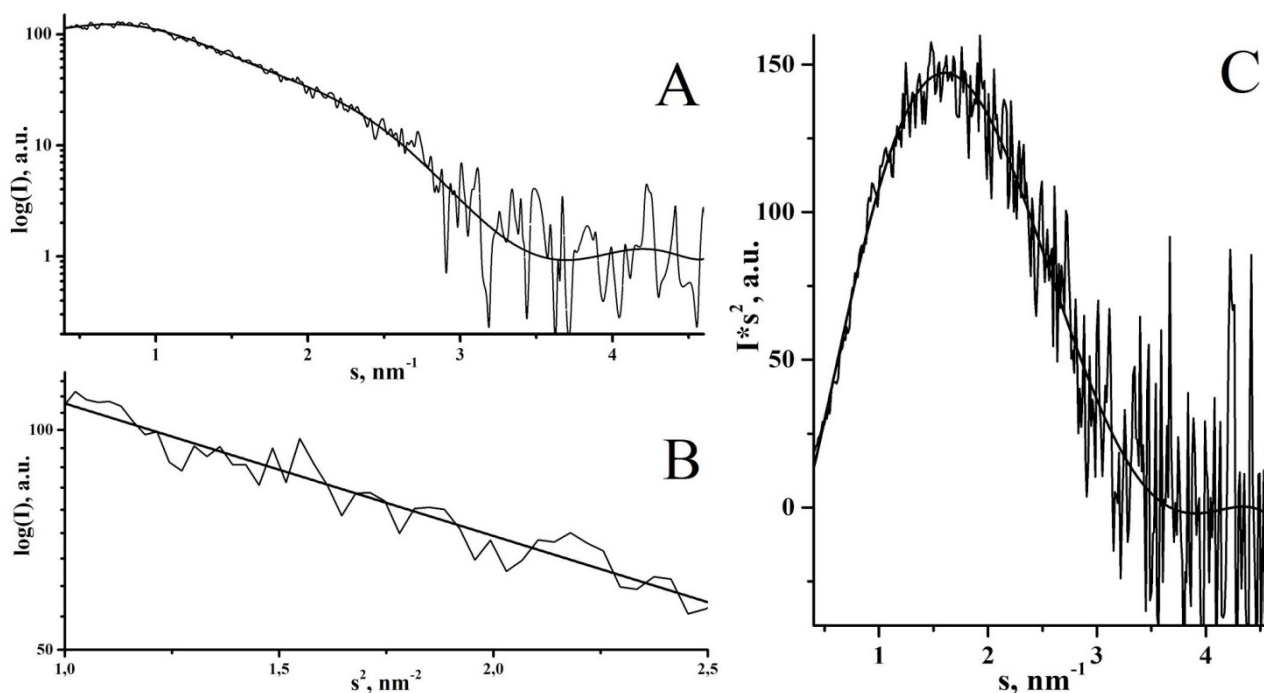


Рисунок 1 – Графики МУРР (А), Гинье (В) и Кратки (С) для ДНК-аптамера 15ТВА

Далее в программе GNOM [4] с помощью непрямого преобразования Фурье вычислена функция распределения по расстояниям $p(r)$ между рассеивающими центрами внутри молекулы. Таким образом, осуществлён переход от обратного пространства в прямое. График представлен на рис. 2, А. Наибольшее значение функции дало максимальный размер молекулы $D_{\text{max}}=3$ нм. На основе функции $p(r)$ в программе DAMMIF [5] произведено моделирование трёхмерной структуры молекулы аптамера 15ТВА путём подбора такой модели, для которой компьютерная симуляция эксперимента МУРР даст кривую рассеяния, минимально отличающуюся от экспериментальной. Полученная модель представлена на Рис. 2, В.

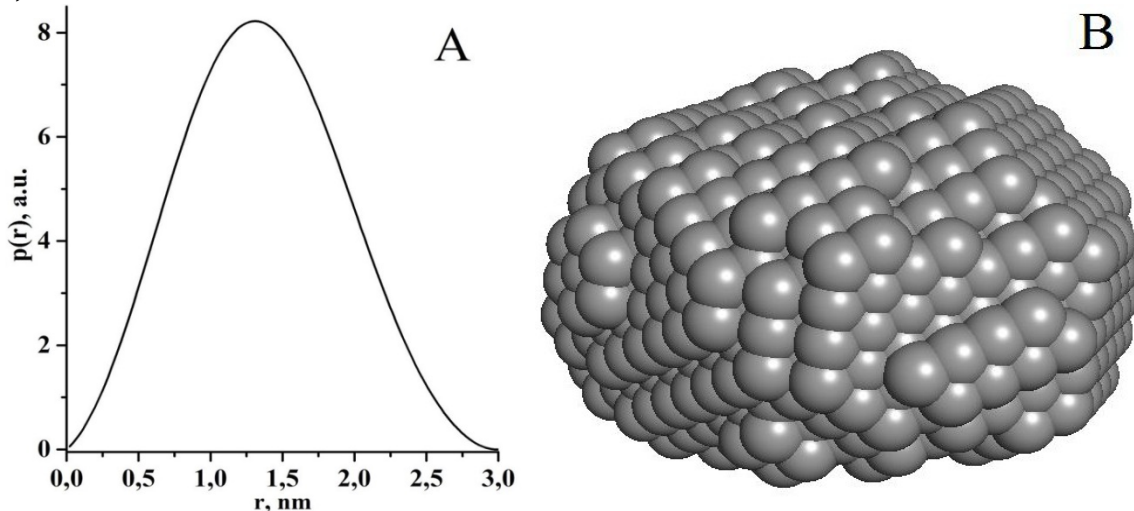


Рисунок 2 – функция распределения по расстояниям $p(r)$ (А) для аптамера 15ТВА и трёхмерная модель, полученная в программе DAMMIF (В)

Модель рассчитана из начальной сферы, диаметр которой равен D_{max} , форма модели действительно близка к сплюснутой сфере, что показал и анализ Кратки.

Заключение. В ходе эксперимента МУРР были получены графики рассеяния рентгеновского излучения на ДНК-аптамере 15ТВА в буферном растворе, вычислены основные конформационные параметры, построена трёхмерная модель общей электронной оболочки молекулы. Размеры и форма модели хорошо согласуются со структурами, полученными из РСА, модели которых были взяты в общедоступной базе биомолекул Protein Data Bank.

Литература

1. Bock L. C. et al. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin // *Nature*. – 1992. – Т. 355. – №. 6360. – С. 564.
2. Guiner A., Fournet G., Walker C. B. Small angle scattering of X-rays // J. Wiley & Sons, New York. – 1955.
3. Doniach S. Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering // *Chemical Reviews*. – 2001. – Т. 101. – №. 6. – С. 1763-1778.
4. Semenyuk A. V., Svergun D. I. GNOM—a program package for small-angle scattering data processing // *Journal of Applied Crystallography*. – 1991. – Т. 24. – №. 5. – С. 537-540.
5. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering // *Journal of applied crystallography*. – 2009. – Т. 42. – №. 2. – С. 342-346.

РАЗДЕЛ 3.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

НОВЫЕ МЕТОДЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД И УСТАНОВЛЕНИЯ КЛАССА ОПАСНОСТИ ОТХОДОВ: РАЗРАБОТКА, СЕРТИФИКАЦИЯ, ВНЕДРЕНИЕ

Ю.С. Григорьев, Т.Л. Шашкова, Е.С. Стравинскене

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

E-mail: gr2897@gmail.com

В настоящее время для биотестирования природных и сточных вод разработан достаточно широкий набор методик. Вместе с тем, большинство из используемых в России и за рубежом методик биотестирования не обеспечены комплексом аппаратуры для создания стандартных условий работы с тест-организмами и автоматизации самого процесса измерения. Без такого оборудования трудно добиться хорошей воспроизводимости результатов токсикологического анализа.

В связи с этим в СФУ разработаны новые методы и аппаратура для биотестирования токсичности различных вод и отходов.

Применение высокопродуктивного штамма водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) позволило существенно сократить продолжительность анализа. Для наращивания тест-культуры водоросли в контролируемых условиях созданы компактные культиваторы [1]. Токсический эффект на водоросль определяется по разнице прироста численности клеток в тестируемых пробах воды по сравнению с контрольной водой. На этой основе разработана методика биотестирования с длительностью анализа токсичности вод и отходов 22 часа [2].

В качестве рачкового тест-объекта были взяты дафнии (*Daphnia magna* Straus). Для работы с ними созданы климатостаты, которые поддерживают необходимую температуру и световой режим при выращивании культур рачков. Сам процесс биотестирования выполняется в устройствах экспонирования рачков, обеспечивающих активный газообмен с внешней средой [3]. Длительность биотестирования по разработанной методике составляет 48 часов [4].

В целях экспрессного выявления токсичности вод был использован разработанный нами метод регистрации относительного показателя интенсивности замедленной флуоресценции (ОПЗФ) водоросли хлорелла [5]. Данный показатель может быть измерен в течение нескольких секунд, выделяя до 100 градаций состояния тест-организма. Для реализации метода был изготовлен флуориметр, который в автоматическом режиме может анализировать на токсичность до 24 образцов. С учетом пробоподготовки время анализа по разработанной методике биотестирования токсичности вод и отходов не превышает 1,5 часа [6].

На разработки получено 5 патентов России. Созданные методики биотестирования вод аттестованы для целей государственного экологического контроля в РФ [2, 4, 6]. Разработаны и утверждены Технические условия на три модели климатостатов для содержания тест-организмов (ТУ 4211-008-26218570-2009), четыре модели культиваторов для их выращивания (ТУ 3615-006-26218570-2009), флуориметр Фотон 10 (ТУ 4437-007-26218570-2009). Прибор для регистрации оптической плотности суспензий (ИПС-03, ТУ 4437-003-26218570-2006) утвержден как средство измерения в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии под № 64104-16 и допущен к применению в РФ.

С целью проведения маркетинговых работ и обеспечения внедрения своих разработок Сибирский федеральный университет в 2006 году заключил лицензионный договор с коммерческой компанией ЗАО «Спецкомплектресурс 2001» (г. Москва). В настоящее время такой договор заключен с ООО «Европолитест» (г. Москва).

Производство продукции и ее сертификация организованы на малом предприятии ООО «Омикрон» (г. Красноярск). Обучение пользователей разработок проводит СФУ, регулярно организуя школы по биотестированию и осуществляя научно-методическое консультирование специалистов. Обучение прошло более 150 специалистов.

В сотрудничестве с партнерами приборы и методики в настоящее время внедрены в более 400 лабораториях Ростехнадзора, Росприроднадзора, Роспотребнадзора, а также во многих других экологических службах и организациях России. Кроме того, разработки используются в СФУ, а также в 25 российских университетах (МГУ, СПбГУ, КГУ, ТГУ и др.) для подготовки специалистов экологического профиля и выполнения научных исследований.

Литература

1. Григорьев Ю.С., Андреев А.А. Устройство для выращивания микроводорослей: Пат. РФ № 2165973. Оpubл. 27.04.2001. Бюл. изобр. № 12.

2. Григорьев Ю.С. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 / Т 16.1:2:2.3:3.7-04 Москва 2004, 36 стр. (издание 2014).

3. Григорьев Ю.С., Шашкова Т.Л. Способ биотестирования токсичности воды на низших ракообразных животных: Пат. РФ № 2377560. Оpubл. 27.12.2009. Бюл. изобр. № 36.

4. Григорьев Ю.С., Шашкова Т.Л. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 / Т 16.1:2:2.3:3.9-06 Москва, 2006, 42 стр. (издание 2014)

5. Григорьев Ю.С., Андреев А.А., Кравчук И.С., Гекк П.И. Способ биотестирования токсичности вод и водных растворов. Патент на изобретение № 2482474. Оpubл. 20.05.2013. Бюл. изобр. № 14.

6. Григорьев Ю.С., Стравинскене Е.С. Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 / Т 16.1:2:3:3.14-09 Москва, 2009, 36 стр. (издание 2014 г.)

АВТОНОМНЫЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКИ КОМФОРТНЫЙ ТИП ЖИЛЬЯ ДЛЯ ОСВОЕНИЯ АРКТИКИ

С.И. Барцев, А.Г. Дегерменджи, В.А. Охонин, А.А. Тихомиров.

*Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский
научный центр СО РАН», Академгородок, 660036 Красноярск, Россия*

E-mail: bartsev@yandex.ru

Промышленное и военное освоение Арктики невозможно без обеспечения условий жизни, позволяющих длительное время поддерживать самочувствие, работоспособность и боеготовность работников и личного состава на хорошем уровне. Факторами, осложняющими проживание людей в арктических природных условиях, являются: длительные морозы, требующие больших запасов топлива для обогрева и загрязняющие

выхлопами окружающую среду, а также вынуждающие жителей Арктики большую часть времени проводить в помещениях (дома или на производстве) при низком качестве воздуха; низкая среднегодовая активность биоты, препятствующая полному разложению отходов жизнедеятельности, что формирует антисанитарную обстановку в непосредственной близости от мест компактного проживания людей; дефицит свежей витаминсодержащей пищи.

Поскольку арктические природные условия мало приспособлены к жизни человека, особенно зимой, то возникает задача сходная с задачей обеспечения жизнедеятельности человека вне биосферы (в условиях космоса) при минимизации воздействия на окружающую среду. Принятие этой точки зрения влечет за собой, с одной стороны, тщательный анализ имеющихся традиционных подходов к обеспечению проживания людей в условиях Крайнего севера, а с другой стороны, оценку возможностей использования идей и технологий, развиваемых в области космических систем жизнеобеспечения (СЖО).

Разрешение противоречия между обеспечением комфортных условий жизни и минимальным воздействием на экосистему может быть осуществлено на основе оптимального сочетания замкнутости потоков веществ; автономных источников энергии; оптимальной компоновки жилищ и многоступенчатого использования энергии через биологические компоненты интерьера.

Специальная компоновка жилых арктических домов позволит на порядок сократить затраты на зимнее отопление. При этом поддержание качества воздуха (ревитализация) в условиях пониженного воздухообмена с внешней средой обеспечивается бытовыми оранжереями. Эти оранжереи представляют собой технологические устройства, выполняющие совмещенные функции – отопление жилого помещения, его освещение, увлажнение зимнего пересушенного воздуха, выращивание используемых в пищу, декоративных или целебных растений. Блок переработки бытовых и физиологических отходов и частичное замыкание потоков веществ в системе позволят понизить разрушающее воздействие на окружающую среду почти до нуля.

Таким путем снимается проблема обеспечения экономии электроэнергии при одновременном поддержании высокого качества воздушной среды в помещениях при минимальном разрушающем воздействии на окружающую среду.

Поскольку Арктическая СЖО (АСЖО) должна поддерживать жизнь людей с высокой степенью надежности, то ориентация на привозные источники энергии (дизельное топливо, уголь) делает систему весьма уязвимой и зависящей от внешних факторов: погодных условий, экономической ситуации, блокады транспортных путей. Естественным решением является использование природных источников энергии. В то время, как использование солнечной энергии в условиях Севера может носить только вспомогательный характер в летнее время, энергия ветра доступна круглый год. Оценки показывают, что запасы доступной ветровой энергии в 25 раз покрывают нынешнее энергопотребление человечества. Однако ее прямое использование практически невозможно вследствие ее огромной скажкости – временной неоднородности. Так даже при усреднении по интервалу в 32 дня, имеются перепады мощности от 21 процента до 216 процентов – в десять раз. Следовательно, существует проблема автономного обеспечения АСЖО электроэнергией постоянной гарантированной мощности при принципиальной нестабильности ее природного источника.

Эту проблему можно решить с помощью энергетического комплекса, состоящего из ветрового генератора, теплового особо долговечного накопителя (ТОДН) энергии и высоконадежной тепловой машины замкнутого цикла (двигатель Стирлинга), сопряженного с электрическим генератором. Предлагаемая конструкция ТОДН, основанная на макрокомпозитном управлении тепловыми потоками позволяет одновременно решить и

проблему постоянства температуры на выходе теплового аккумулятора по мере его разрядки и проблему уменьшения тепловых потерь с помощью активной тепловой защиты.

Важно отметить, что оборудование и технологии, разработанные для космических СЖО, могут быть использованы для создания экологического жилья для Арктики. В Институте биофизики СО РАН (ФИЦ КНЦ СО РАН) на основании многолетних исследований проведена концептуальная разработка АСЖО, сделаны расчеты режимов теплообмена и освещения, проведен предварительный подбор растений, рассмотрены возможные оптимальные планировки экодому для полярных районов. Предложены оптимальные компоновки экологических коттеджей и многоквартирных домов.

ПРИНЦИП РАБОТЫ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ЛИКВИДАЦИИ РАЗЛИВОВ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Д. А. Нечаев

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Институт
природных ресурсов, г. Томск, пр. Ленина, 30, Россия*

E-mail: nechaevdmitryrf@gmail.com

Вопросы экологической безопасности в нефтяной промышленности являются в настоящее время одной из ключевых проблем. Для решения этой проблемы разрабатываются и внедряются различные методы и устройства для обезвреживания аварийных разливов нефти с целью предупреждения негативных последствий воздействия нефтепродуктов на окружающую среду.

Цель и результаты исследования – разработка функциональной модели, которая позволит проектировать многофункциональные устройства, обеспечивающие быстрый и качественный процесс ликвидации аварийного разлива нефти (ЛАРН) [2]. Для достижения цели были выполнены следующие виды работ:

- проведен анализ рынка устройств, используемых при ликвидации разливов нефтепродуктов в различных условиях;
- осуществлена классификация данных устройств по уровню агрегатирования, т.е. по возможности ликвидации разлива одной технологической машиной;
- выделены основные функции, необходимые для полного выполнения процесса ЛАРН.

На основании полученных результатов предложен и охарактеризован принцип работы многофункционального устройства, сочетающего механический и химический способы ликвидации аварийного разлива нефти непосредственно в акваториях рек (рисунок).

Данная конструкция позволяет установке быть мобильной, универсальной и более простой в эксплуатации без снижения эффективности по сравнению с существующими аналогами. Использование ковша в качестве основы конструкции позволяет производить ЛАРН уже с первого уровня реагирования по Федеральному плану ЛРН [3]. Таким образом, данная установка позволяет значительно уменьшить время ликвидации разлива, сохраняя при этом качество процесса удаления загрязняющего нефтепродукта.

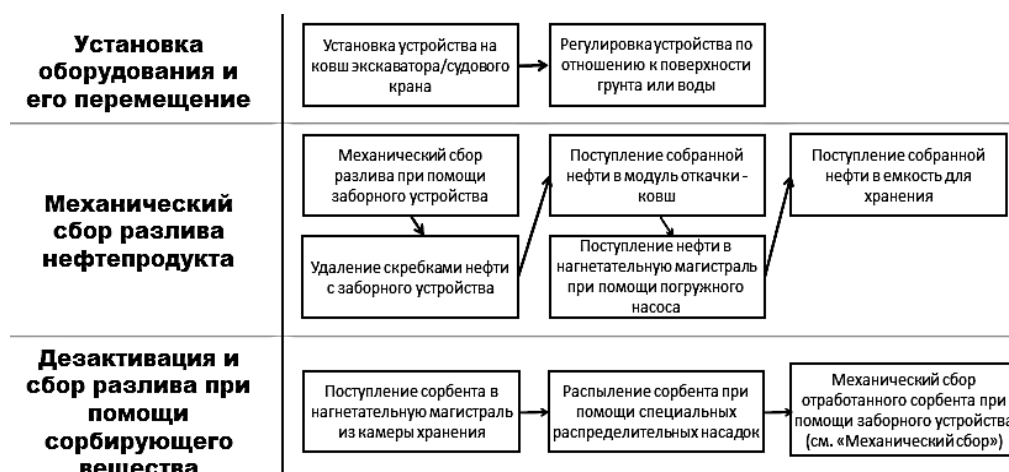


Рисунок – Схема работы универсального многофункционального устройства ЛАРН

Литература

1. Луценко А.Н., Катин В.Д. Передвижная установка для очистки рабочих поверхностей от разливов нефтесодержащих жидкостей и сбора сыпучих мелкокусковых материалов: Пат. 104197 Российская Федерация: МПК E01P 1/08 (2006.01). Хабаровск, ДВГУПС. № 2010144258/21; заявл. 28.10.2010; опубл. 10.05.2011, Бюл. №13. 3 с.
2. Нечаев Д.А., Чухарева Н.В. Применение функциональной модели при конструировании универсальной установки, предназначенной для ликвидации разливов нефтепродуктов; «Безопасность-2017»: XXII Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием ««Проблемы экологической и промышленной безопасности современного мира», 2017 г.; С. 196-198.
3. РД 153-39.4-114-01 Правила ликвидации аварий и повреждений на магистральных нефтепроводах [Электронный ресурс] //http://www.gosthelp.ru – Режим доступа: http://www.gosthelp.ru/text/RD15339411401Pravilalikvi.html, свободный. – Загл. с тит. экрана (дата обращения: 10.06.2017).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ ПРИ ПОПАДАНИИ В ВОДНЫЕ ОБЪЕКТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

А.И. Кашкевич, С.И. Метелица, В.Н. Лосев

НИИЦ «Кристалл» Сибирского федерального университета, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

E-mail: a-n-n07@mail.ru

В последнее время большое внимание уделяется контролю состояния объектов окружающей среды, что связано с многофакторным воздействием на них как естественного, так и антропогенного характера. Утечки горюче-смазочных материалов при эксплуатации промышленных объектов и транспорта приводят к загрязнению окружающей среды, наиболее уязвимой частью, которой являются водные экосистемы, являющиеся источником питьевой воды и средой обитания живых организмов.

Характер воздействия на живые организмы при попадании горюче-смазочных материалов и нефтепродуктов в объекты окружающей природной среды связан с составом углеводородной смеси. Известно, что ряд углеводородов активно поглощается некоторыми

микроорганизмами и растениями, в результате чего их негативный эффект заметно снижается. Поэтому важным элементом при контроле состояния, в частности, водных объектов, необходимо использовать методы, позволяющие отдельно идентифицировать углеводороды. Люминесцентный метод занимает особое место для обнаружения и идентификации сложных органических молекул, в том числе нефтепродуктов, обладающих люминесценцией.

Цель работы – исследование возможности идентификации нефтепродуктов люминесцентным методом в природных водах.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась вода р. Енисей, загрязненная промышленными маслами: турбинным маслом (Т-30), трансформаторным (Т-750), индустриальным (И-30). Масла экстрагировали из воды гексаном и регистрировали их спектральнолюминесцентные характеристики на спектрофлуориметре Cary Eclipse фирмы Varian (Австралия).

Результаты. При облучении УФ-светом экстракты масел люминесцируют синевioletовым светом. Максимумы спектров возбуждения люминесценции (рис. 1) для всех трех образцов масел расположены при 480 нм. Спектры возбуждения люминесценции представляют собой широкие полосы в области 400-500 нм со слабо выраженной структурой для образцов масел Т-30 и И-30. Различия в спектрах возбуждения люминесценции в области 300-350 нм и наличие слабо разрешенной структуры в спектрах люминесценции использовано для идентификации масел в природных водах.

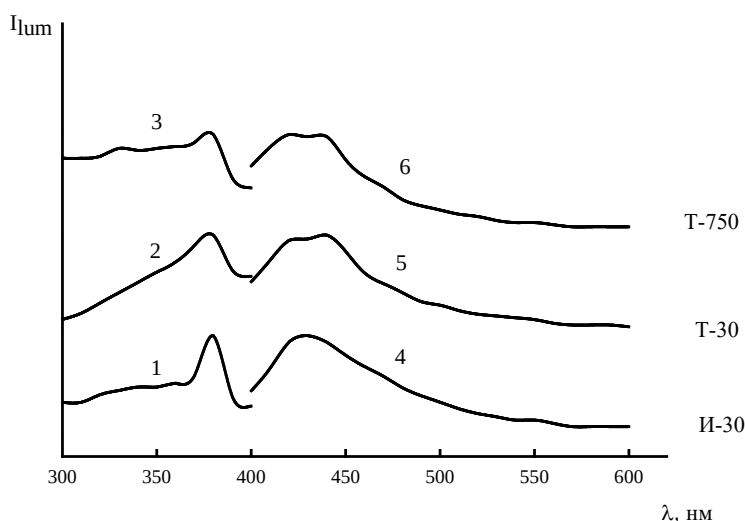


Рисунок 1 – Спектры возбуждения люминесценции (1-3) и люминесценции (4-6) масел И-30 (1,4), Т-30 (2,5), Т-750 (3,6)

Более четкая идентификация органических соединений достигается люминесцентным методом, получившему название «метод отпечатков пальцев» (fingerprints), при использовании трехмерных спектров люминесценции, характерных для индивидуальных соединений. Проекция трехмерных спектров люминесценции приведены на рис. 2.

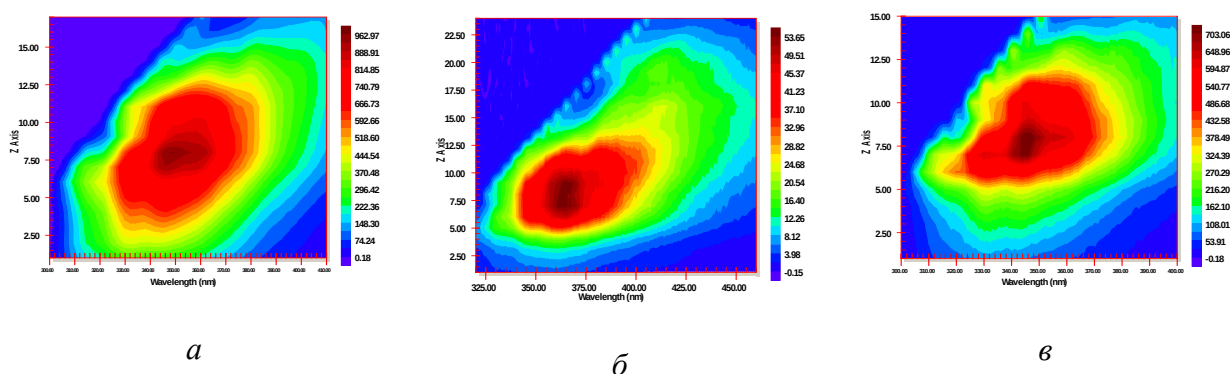


Рисунок 2 – Проекции трехмерных спектров люминесценции масел И-30 (а), Т-30 (б), Т-750 (в).

Различие в трехмерных спектрах люминесценции позволяет более точно провести идентификацию масел.

Заключение. Показано, что люминесцентный метод в варианте регистрации спектров возбуждения люминесценции и люминесценции в варианте регистрации трехмерных спектров люминесценции может быть использован для идентификации нефтепродуктов, как загрязнителей природных вод.

ДЕТОНАЦИОННЫЕ НАНОАЛМАЗЫ – НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Н.О. Ронжин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь

Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Академгородок, 660036 Красноярск, Россия

E-mail: roniol@mail.ru

Одной из актуальных задач современной аналитики является разработка простых и эффективных средств мониторинга качества воды и быстрого выявления нежелательных и токсичных соединений в сточных водах и окружающей среде. К наиболее распространенным во всем мире экологическим токсикантам, поступающим в водоемы со стоками предприятий, относятся фенолы и их производные. Для создания новых средств детекции фенола в водных средах интерес могут представлять модифицированные наноалмазы (МНА) детонационного синтеза [1,2]. МНА содержат на своей поверхности различные химически активные группы и микропримеси металлов и проявляют каталитическую активность в реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-аминоантипирин – перекись водорода), которая сопровождается образованием окрашенного продукта [3, 4].

Цель работы – исследование причин каталитического эффекта частиц МНА в реакции окислительного азосочетания и оценка применимости данных наночастиц для многократного тестирования фенола в водной среде.

Материалы и методы. В экспериментах использовали образцы МНА со средним размером кластеров (d_{50}) в гидрозолях 50 и 270 нм, полученные из взрывных наноалмазов российского производства (ООО Реал-Дзержинск, Россия) разработанным ранее способом [5]. Распределение размеров кластеров изучаемых образцов МНА в гидрозолях оценивали с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Англия).

Применяемые реагенты: 4-аминоантипирин (4-ААП) квалификации «чда» (Реахим, Россия), фенол (Flucka, Германия), 3%-ный раствор перекиси водорода (ОАО

Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга, Россия), соль хлорида натрия и соли двух- и трехвалентных металлов российского производства квалификации «хч» и «чда».

При проведении реакции окислительного азосочетания конечная концентрация ингредиентов в объеме реакционной смеси составляла: 0.03% перекиси водорода; 0.10 мг/мл 4-ААП; 0.56 мг/мл фенола. Реакцию инициировали добавкой растворов ионов металлов (концентрация в пробе 5×10^{-4} мг/мл) или гидрозоля МНА (концентрация в пробе 0.5 мг/мл). Количество образовавшегося в ходе реакции цветного продукта определяли с помощью спектрального анализа образцов после удаления из них частиц МНА. Спектральную оценку проводили на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) по величине оптической плотности образцов при длине волны 506 нм.

Содержание примесей ионов металлов в образцах МНА с разными размерами кластеров оценивали с помощью элементного анализа наночастиц на электронном микроскопе ТМ-1000 (Hitachi, Япония).

Результаты. Установлено, что каталитический эффект МНА в реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-аминоантипирин – перекись водорода) реализуется благодаря микропримесям ионов железа и меди (рис. 1) на поверхности наночастиц.

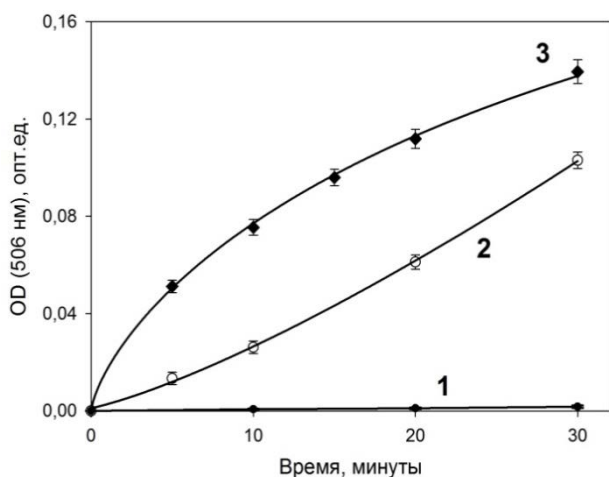


Рисунок 1 – Зависимость образования продукта реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-ААП – перекись водорода) от времени инкубации образцов: 1 – без катализатора; 2 и 3 – при добавке ионов меди и железа, соответственно.

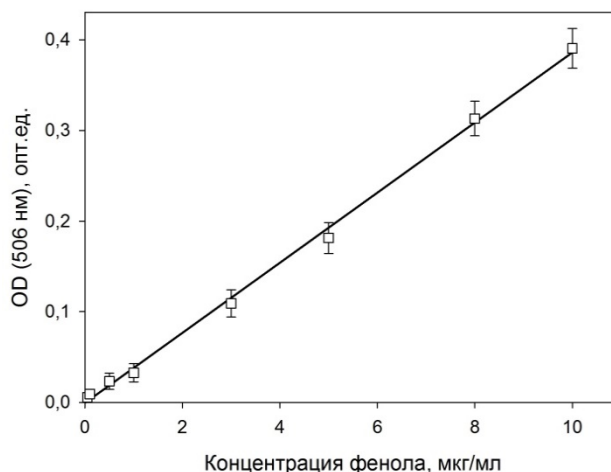


Рисунок 2 – Зависимость образования продукта реакции, катализируемой МНА, от концентрации фенола (инкубация образцов 10 минут при 40°C).

Выявлено, что в данной реакции каталитическая эффективность МНА с разными размерами кластеров определяется количеством поверхностных примесей этих ионов. Показано, что при выбранных условиях эксперимента повышение температуры катализируемой МНА реакции азосочетания приводит к значительному (до 4,5 раз) увеличению выхода цветного продукта. Исследован каталитический эффект МНА в реакции азосочетания после дополнительной адсорбции на поверхности наночастиц ионов железа и меди. Результаты экспериментов свидетельствуют, что каталитическая эффективность МНА при тестировании фенола может быть увеличена в 1,7 и 2 раза за счет дополнительной адсорбции на поверхности наночастиц ионов меди или железа, соответственно. Показано, что применение МНА для тестирования фенола в водной среде обеспечивает линейный выход цветного продукта реакции азосочетания в интервале концентраций аналита 0,05 – 10 мкг/мл (рис. 2).

В модельных экспериментах продемонстрирована возможность многократного использования МНА для тестирования фенола в водной среде. Показано, что при последовательном четырехкратном применении частиц МНА для определения фенола в водных образцах с одинаковой концентрацией аналита наблюдается практически одинаковый выход цветного продукта. Результаты проведенных исследований имеют практическое значение и открывают перспективы разработки на основе МНА новых индикаторных средств многоразового действия для выявления фенола и фенольных соединений в водных средах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 16-43-243027.

Литература

1. Бондарь, В.С. Наноалмазы для биологических исследований / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 46 (4). – С. 698–701.
2. Puzyr, A.P. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky, G.E. Selyutin, V.F. Kargin // NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem. – 2005. – V. 192. – P. 261–270.
3. Бондарь, В.С. Каталитическая активность наноалмазных частиц в органических реакциях / В.С. Бондарь, К.В. Пуртов, А.П. Пузырь, А.В. Барон, И.И. Гительзон // ДАН. – 2008. – Т. 418. – С. 267–169.
4. Ronzhin, N.O. Catalytic activity of nanodiamonds in azocoupling reaction / N.O. Ronzhin, A.P. Puzyr, A.E. Burov, V.S. Bondar // J. Biomat. Nanobiotech. – 2014. – V. 5. – P. 173–178.
5. Патент РФ 2252192. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью / А.П. Пузырь, В.С. Бондарь; опубл. 20.05.2005. – Бюл. № 14.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ

Л.В. Степанова, Л.М. Байгина, В.С. Матвиенко, Н.В. Римацкая, А.А. Шпед

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

E-mail: slyudmila@mail.ru

Экологическое состояние почвы является универсальным индикатором состояния биосферы, поэтому почвенный мониторинг зачастую используют для оценки загрязнения природной среды. Крайне негативное влияние на почву оказывают техногенные воздействия, которые являются источниками химического загрязнения, например тяжелыми металлами [3]. Существующие методы химического и биологического тестирования ограничены в возможностях. В настоящее время для экспрессной оценки загрязнения сложного по биологическому составу объекта, как почва, в Лаборатории биолюминесцентных технологий СФУ разрабатывается методика ферментативного биолюминесцентного биотестирования, аналогично разработанной для экологического мониторинга водных экосистем [4,5]. Конструирование бактериальной ферментативной тест-системы построено на концепции люциферазного биотестирования и основано на изучении воздействия биологического состава почвы в нативном состоянии и в условиях ее токсикологического загрязнения на

маркеры – субстраты биolumинесцентных реакций и активности ключевые ферментов в сопряженных с люциферазой в ферментативных цепочках. Основой для конструирования биolumинесцентного метода анализа является биферментная система светящихся бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза. При биolumинесцентном тестировании происходит снижение интенсивности свечения, обусловленное угнетением ферментативной реакции загрязнителями [4, 5]. Таким образом, экспресс-биотест молекулярно-ферментативной природы может быть приемлемым для информативного и надежного контроля загрязнения почвы.

Цель исследования – определение возможности использования биolumинесцентного ферментативного биотеста для выявления техногенного загрязнения почвы.

Материалы и методы. Красноярским Референтным Центром Россельхознадзора (КРЦ) были предоставлены пробы почв ($n=134$) для тестирования, взятые в окрестностях г. Красноярска в периоды неблагоприятной экологической обстановки (режим «черного неба»). Почвы были взяты в разрезах глубиной до 20 см и проанализированы на содержание металлов и гумуса, определены pH и гранулометрический состав в соответствии с требованиями нормативных документов [1]. Водную вытяжку почвы готовили в соответствии с нормативными документами [2] при разбавлении 5-и кратным объемом дистиллированной воды.

Биolumинесцентное тестирование пробы почв проводили с использованием бактериальной биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, входящих в комплект реактивов КРАБ (Институт биофизики СО РАН, Красноярск). Свечение реакционной смеси регистрировали на люминометре Promega GloMax (США). В качестве показателя общего загрязнения использовали остаточное свечение (T , %), вычисляемое как отношение максимальных интенсивностей свечения в присутствии водной вытяжки почвы и дистиллированной воды (контроль). При $T>80\%$ исследуемые пробы считали не загрязненными, $50\%<T<80\%$ – загрязненными, $T<50\%$ – сильно загрязненными.

Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ Excel (Microsoft, США). Корреляционную связь оценивали по критерию Спирмена. Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p<0,05$).

Результаты химического анализа показали, что почвы относятся к слабощелочным (7,5-8,5 pH) с содержанием фракций мелкой пыли менее 50% от общей массы. Содержанию металлов в пробах было превышено по сравнению с ПДК. Биolumинесцентное тестирование выявило загрязнение проб почв, загрязненных мышьяком, сильное загрязнение показали пробы, содержащие свинец и фтор, как показано в таблице.

Таблица – Показатели химического анализа и биolumинесцентного тестирования почв ($M\pm s$)

Элемент - загрязнитель	Содержание загрязнителя, мг/кг	Содержание гумуса, %	Кислотно-основное состояние (pH_2O)	Сумма частиц менее 0,01 см, %	Остаточное свечение, %
Свинец ¹	113,6 $\pm$ 100,1 ^в	7,4 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 0,5	28,1 $\pm$ 3,9	31,0 $\pm$ 14,1
Фтор ²	180,6 $\pm$ 69,2 ^р	6,3 $\pm$ 2,8	7,8 $\pm$ 0,4	37,2 $\pm$ 6,6	46,5 $\pm$ 15,0
Мышьяк ³	5,2 $\pm$ 2,4 ^в	4,8 $\pm$ 2,6	8,3 $\pm$ 0,4	40,4 $\pm$ 5,1	50,1 $\pm$ 17,5

Примечание: ¹ - $n=19$; ² - $n=59$; ³ - $n=56$; ^в – валовое, ^р - водорастворимое.

Анализ корреляционных связей между возрастанием остаточного свечения и показателями химического анализа показал, что для проб почв, содержащих фтор, на результаты анализа влияют уменьшение содержания в образцах водорастворимой формы фтора ($r=0,66$), а также увеличение содержания гумусовых веществ ($r=-0,92$), pH ($r=-0,77$) и гранулометрического состава ($r=-0,70$). В образцах почв, содержащих мышьяк, на

результаты анализа влияют увеличение валового содержания мышьяка ($r=-0,42$), гумусовых веществ ($r=-0,94$) и гранилометрического состава ($r=-0,92$), уменьшение pH ($r=0,83$). В образцах почв, содержащих свинец, на результаты анализа влияет увеличение водорастворимого содержания свинца ($r=-0,4$) и гранилометрического состава ($r=-0,4$). При этом водорастворимая форма свинца в водных вытяжках почв составляла 0,1% от валовой формы.

Заключение. Показана возможность использования биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в качестве диагностического интегрального показателя техногенного загрязнения почвы. Независимо от природы элемента-загрязнителя величина остаточного свечения, зависящая от концентрации загрязнителя и содержания гумусового вещества, изменяется схоже для всех почв.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (проект №16-14-10115).

Литература

1. Агрохимические методы исследования почв: руководство / под ред. А.В. Соколова. – М.: Наука, 1975. – 656 с.
2. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 17.4.4.02-84 – 2008. – Введ. 1986-01-01. – М.: Стандартинформ, 2008. – 8 с.
3. Оценка экологического состояния почвенно-земельных ресурсов и окружающей природной среды Московской области. – М.: Изд-во МГУ, 2000. – 221 с.
4. Esimbekova, E. Application of enzyme bioluminescence in ecology / E. Esimbekova, V. Kratasyuk, O. Shimomura // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2014. -Vol. 144. – P. 67-109.
5. 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.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ РЕАГЕНТ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

В.И. Лоншакова-Мукина¹, Е.Н. Есимбекова^{2,1}, В.А. Кратасюк^{1,2}

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

²Институт биофизики СО РАН (ФИЦ «КНЦ СО РАН»), Академгородок, 50/50. 660036
Красноярск, Россия

E-mail: viktoriya.lww@gmail.com

В настоящее время широко используется спектр аналитических систем на основе холинэстераз для экспрессной оценки токсичности экосистем различной сложности. Связано это в первую очередь с их высокой чувствительностью и селективностью определения ингибиторов. Тем не менее, практическое использование любых ферментативных методов контроля объектов окружающей среды на сегодняшний день остается весьма ограниченным. И связано это не столько с отсутствием нормативной базы их применения, сколько с проблемами стабильности аналитического сигнала и низкой селективности определения ингибиторов в многокомпонентных средах [1]. Более того, ферменты неустойчивы при различных воздействиях: повышенных температурах, экстремальных значениях pH и т.д. [2].

Для более широкого использования холинэстераз в методах экологического биотестирования, оценки качества воды, воздуха и почвы необходимо получение реагентов, сочетающих стабильность при хранении и использовании с чувствительностью к действию ингибирующих веществ на уровне ПДК.

Цель работы – стабилизация бутирилхолинэстеразы (BuChE) путем её совместной иммобилизации с 5'5-дителиобис (2-нитробензойной кислотой) в гели на основе природных полимеров.

Материалы и методы. Иммобилизацию BuChE в крахмальный гель проводили следующим образом: суспензию крахмала медленно нагревали, доводя до кипения. При проведении иммобилизации в желатиновый гель: суспензию желатина медленно нагревали до 80°C, затем охлаждали до температуры 25°C, последовательно вносили фермент и 5'5-дителиобис (2-нитробензойную кислоту). Полученную смесь тщательно перемешивали. Далее, при помощи автоматической станции пробоподготовки epMotion 5075 фирмы «Eppendorf» (Германия) дозировали по 25 мкл геля, содержащего компоненты систем, на лавсановую пленку и высушивали при температуре 8°C в течение 24 часов. Активность BuChE определяли по методу Элмана [3]. 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) растворимой и иммобилизованной BuChE, по полученным результатам делали вывод об активности иммобилизованных реагентов. Определение оптической плотности образцов проводилось на спектрофотометре UVIKON 943 A (Contron Instruments, Италия). В ходе работы были получены реагенты с различным содержанием BuChE и индикатора на тиоловую группу – 5'5-дителиобис (2-нитробензойной кислоты) (реактив Элмана) в крахмальных и желатиновых носителях. Реагент представляет собой высушенный диск диаметром 6-7 мм, сухой вес $1,5 \pm 0,2$ мг.

Результаты и их обсуждение: На рис. 1 видно, что при включении BuChE как в крахмальный, так и в желатиновый гель активность фермента сохраняется. Внесение в состав реагента 5'5-дителиобис (2-нитробензойной кислоты) не приводит к существенной потере активности реагентов на всем исследуемом диапазоне концентраций. Таким образом, как крахмальный, так и желатиновый гель могут использоваться в качестве носителя для получения иммобилизованных реагентов на основе BuChE.

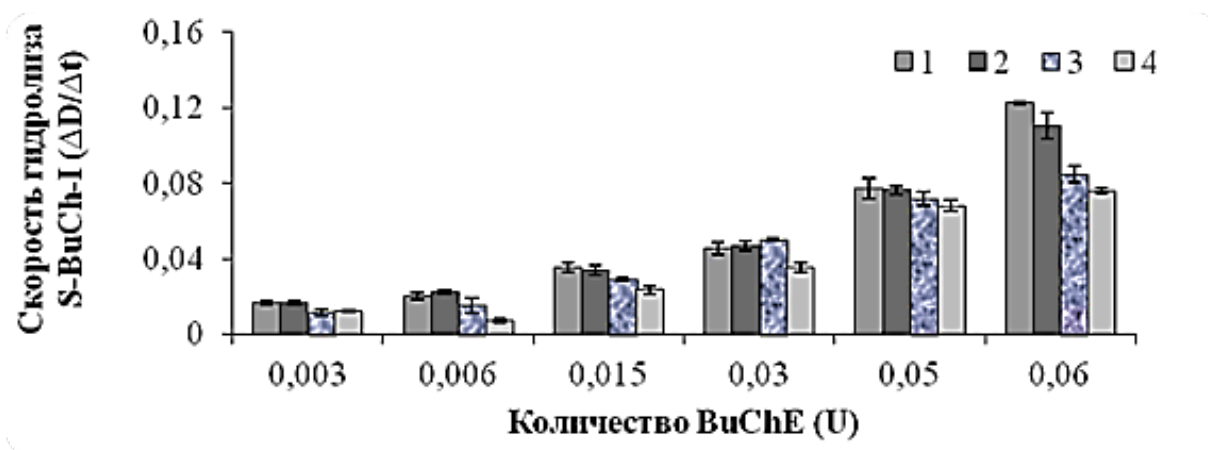


Рисунок 1 – Зависимость скорости гидролиза S-BuCh-I от количества BuChE. 1 – растворимая BuChE, 2 – BuChE, иммобилизованная в крахмальный гель, 3 – BuChE, иммобилизованная совместно с реактивом Элмана в крахмальный гель, 4 – BuChE, иммобилизованная совместно с реактивом Элмана в желатиновый гель

Далее исследовали стабильность при хранении реагентов, представляющих собой BuChE, иммобилизованную совместно с реактивом Эллмана в крахмальный и желатиновый гели. Показано, что реагенты отличаются длительным сроком хранения без потери активности. Так, активность реагентов, содержащих 0,11 U BuChE и 0,2 mM индикатора, не изменяется при хранении в течение 300 суток (рис. 2). Кроме того, показано, что иммобилизованные ферментные реагенты сохраняют активность не только в буферном растворе, но и дистиллированной воде. При использовании вместо буфера дистиллированной воды активность реагентов, полученных на основе крахмального и желатинового гелей, снижается в 2 и 3 раза соответственно. Тем не менее, для дальнейшего использования этих реагентов в биотестировании факт сохранения активности в дистиллированной воде является весьма важным, означающим, что данные реагенты можно использовать для проведения анализа проб классическим способом тестирования, т.е. проверяя уровень безопасного разведения пробы.

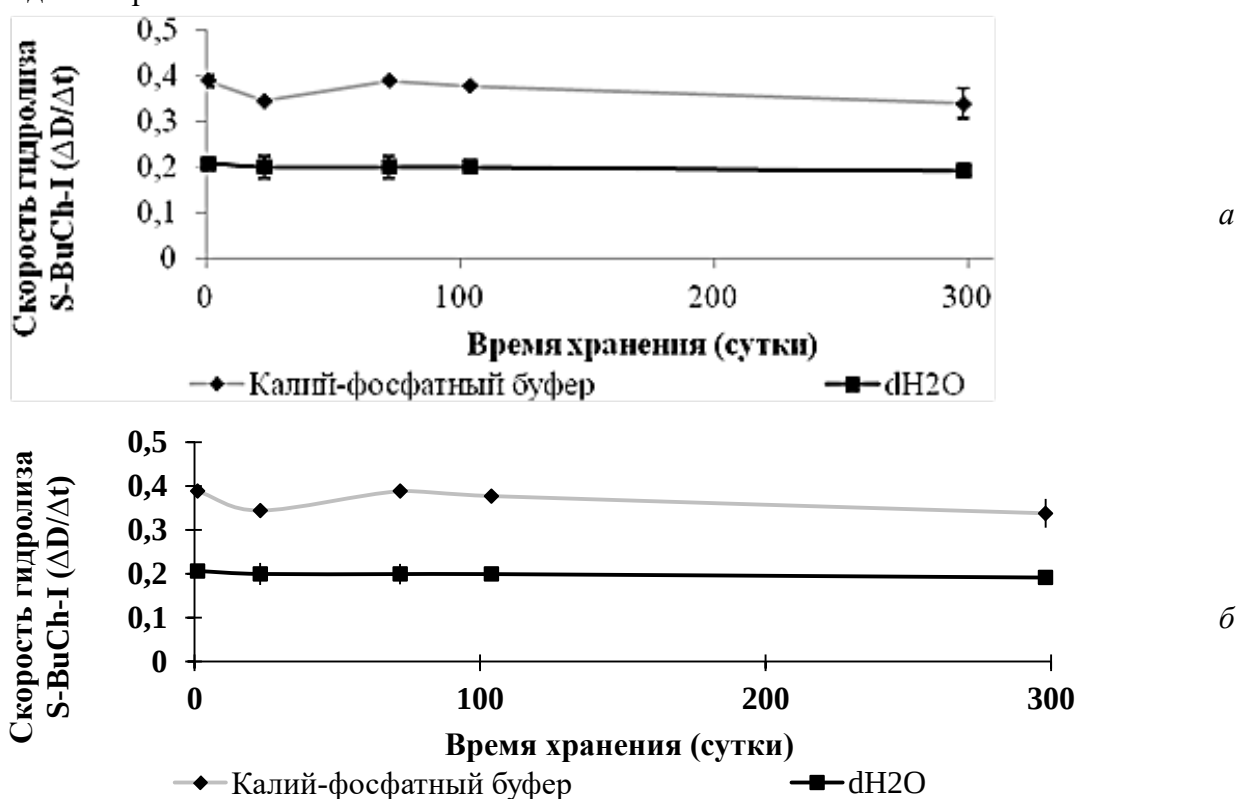


Рисунок 2 – Зависимость скорости гидролиза S-BuCh-I от времени хранения иммобилизованного реагента, содержащего 0,11 U бутирилхолинэстеразы и 0,2 mM реактива Эллмана; а – крахмал, б – желатин

Для исследования чувствительности полученных реагентов к действию фосфорорганических соединений (ФОС) в качестве модельных веществ были выбраны глифосат и малатион, различающиеся по механизму воздействию на BuChE. Для повышения чувствительности определения ФОС была введена процедура предварительной инкубации реагента в исследуемом растворе ингибирующего вещества в течение 5 минут. Установлено, что реагенты на основе желатинового геля не чувствительны к действию модельных ингибирующих веществ. Из рис. 3 видно, что BuChE, иммобилизованная в желатиновом носителе, теряет чувствительность к действию малатиона концентрации 0,5 мкМ, что существенно (в 10 раз) превышает ПДК.

В то же время реагенты на основе крахмального геля снижают свою активность на 74 % в присутствии 0,05 мкМ малатиона, что соответствует уровню ПДК. Концентрация малатиона, при которой наблюдается снижение скорости ферментативного гидролиза S-BuCh-I на 50 % (так называемая величина EC_{50}) составляет 0,5 мкМ. Следовательно, с точки зрения практического использования разрабатываемых реагентов в экоаналитическом контроле над содержанием фосфорорганических соединений в образцах сред, крахмал является наиболее подходящим носителем. Предел обнаружения малатиона в дистиллированной воде составил 5 нМ. Для глифосата чувствительность реагента не достаточна для определения его на уровне ПДК. Предел обнаружения данного соединения в воде составил 80 мкМ. Такой результат может объясняться различиями в механизмах действия выбранных фосфорорганических веществ. Действительно, малатион содержит фосфор, связанный с алкоксильными группами, что влечет образование прочной ковалентной связи «фосфорил-серин» в активном центре BuChE и, как следствие, её необратимое ингибирование. В отличие от малатиона, глифосат содержит фосфор в составе остатка фосфорной кислоты, не способного к проникновению в активный центр фермента.

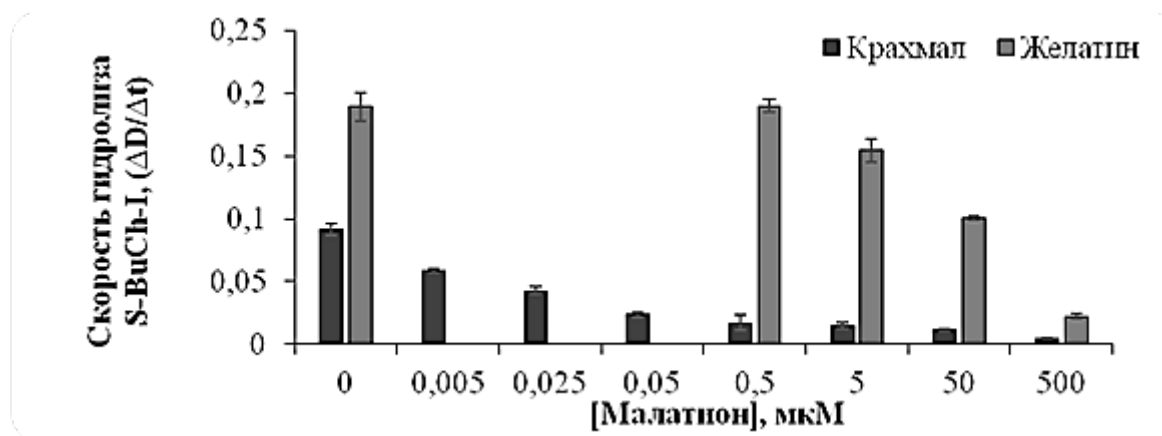


Рисунок 3 – Зависимость скорости ферментативного гидролиза S-BuCh-I от типа носителя в присутствии малатиона В 1 диске: BuChE – 0.11 U, реактив Элмана– 0,2 мМ

Заключение. Установлено, что включение 5’5-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) не приводит к снижению активности иммобилизованной BuChE. Иммобилизация BuChE в крахмальный и желатиновый гели совместно с 5’5-дитиобис (2-нитробензойной кислотой) позволяет получить ферментные реагенты, отличающиеся высокой активностью и стабильностью при хранении в течение 300 суток. Иммобилизованные реагенты проявляют активность не только в буферном растворе, но и в дистиллированной воде. Полученный реагент обладает высокой чувствительностью к действию ФОС.

В дальнейшем разработанный ферментный реагент может использоваться для определения ультрамалых количеств токсических веществ в образцах сред и для контроля за соблюдением установленных норм на содержание ФОС в продукции объектов пищевой промышленности.

Литература

1. Евтюгин Г.А. Электрохимические биосенсоры на основе холинэстеразы для группового определения токсикантов и диагностики загрязнения объектов окружающей среды: дис. док. хим. наук : 02.00.02. – Саратов, 1999. – С. 401.
2. Петушков В.Н. Биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза из светящихся бактерий / В.Н. Петушков, Г.А. Кратасюк, Н.С. Родионова, А.М. Фиш, П.И. Белобров // Биохимия. – 1984. – Т.49, вып.4. – С. 692-702.

3. 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.

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БИОПЛЕНОК НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОБЪЕКТОВ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

А.С. Зорина, Ю.Г. Максимова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

E-mail: cjcuf_92@mail.ru

Практически все известные виды бактерий обладают способностью прикрепляться к различным поверхностям и образовывать биопленки [1]. Хотя биопленки некоторых видов микроорганизмов могут быть вредными, другие биопленки дают большие преимущества при их использовании. Наибольшее применение биопленки нашли в очистке промышленных сточных вод на очистных сооружениях, среди которых наиболее распространены азротенки, метантенки, окситенки, биотенки и биофильтры [2]. Однако все более ужесточающиеся требования к очистке производственных стоков требуют разработки новых, более эффективных решений в области очистки. В связи с чем является актуальным изучение физиологических особенностей моно- и смешанных биопленок для применения их в очистке сточных вод на основе биофильтрующих систем.

Цель исследования – изучение биопленкообразования, массивности полимерного матрикса и содержания АТФ в клетках моно- и бинарных биопленок нитрилгидролизующих бактерий.

Объект исследования – перспективные для биокатализа и биологической очистки штаммы *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Alcafligenes faecalis* 2, обладающие высокой нитрилгидратазной и амидазной активностью соответственно.

В лунки полистирольного плоскодонного 96-луночного планшета вносили синтетическую минеральную среду и инокулировали суспензией нитрилутилизующих бактерий. После 1-7 суток инкубации в термостате при 30 °С планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, отмывали биопленку 200 мкл калий-фосфатного буфера и определяли биопленкообразование по методу окраски кристаллическим фиолетовым, массивность полимерного матрикса методом окраски флуоресцентным красителем konA-тетраметилродамином, энергетический статус клеток биопленок биолюминесцентным методом.

Результаты исследований показали, что матрикс биопленки *Al. faecalis* 2 накапливался к 4 суткам и далее его количество снижалось в течение всех оставшихся суток. Матрикс смешанной биопленки достигал максимальной массивности к 1 суткам и постепенно уменьшался в течение 5 суток; на 6 сутки этот показатель вновь увеличивался с последующим снижением.

Биопленкообразование *Al. faecalis* 2 и биопленок смешанной культуры показано на рис. 1. Максимальное биопленкообразование *Al. faecalis* 2 и смешанной культуры наблюдали на 2 сутки, после чего оптическая плотность постепенно снижалась. На 6 сутки биопленкообразование смешанной культуры снова возрастало и к 7 суткам имело значение, равное 0,56.

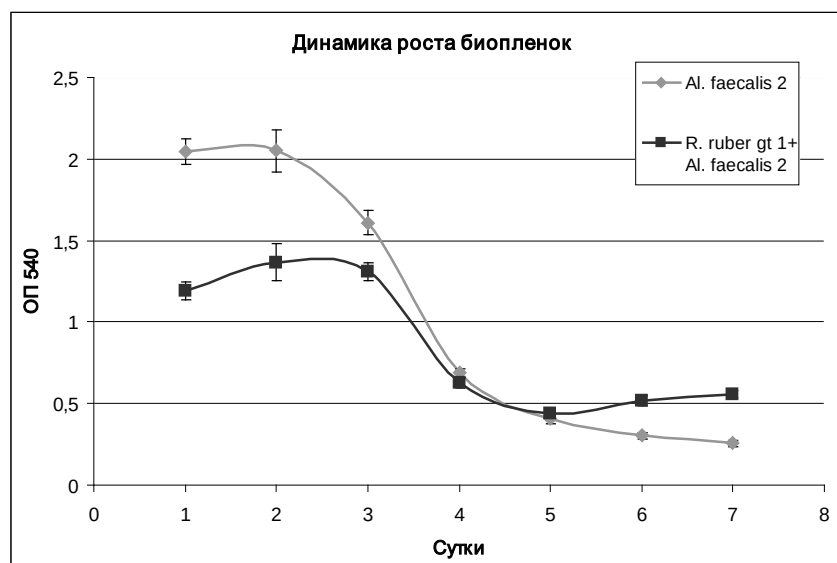


Рисунок 1 – Биопленкообразование клеток *Al. faecalis* 2 и смешанной культуры

Энергетический статус биопленки *Al. faecalis* 2 и биопленки смешанной культуры показан на рис. 2. Наибольшее количество АТФ в клетках биопленки *Al. faecalis* 2 и биопленки на основе смешанной культуры наблюдалось на 2 сутки. Далее количество АТФ в биопленке *Al. faecalis* 2 снижалось в течение всех 7 суток, тогда как в биопленке смешанной культуры снижалось в течение 4 суток, а на 5 сутки снова возрастало.

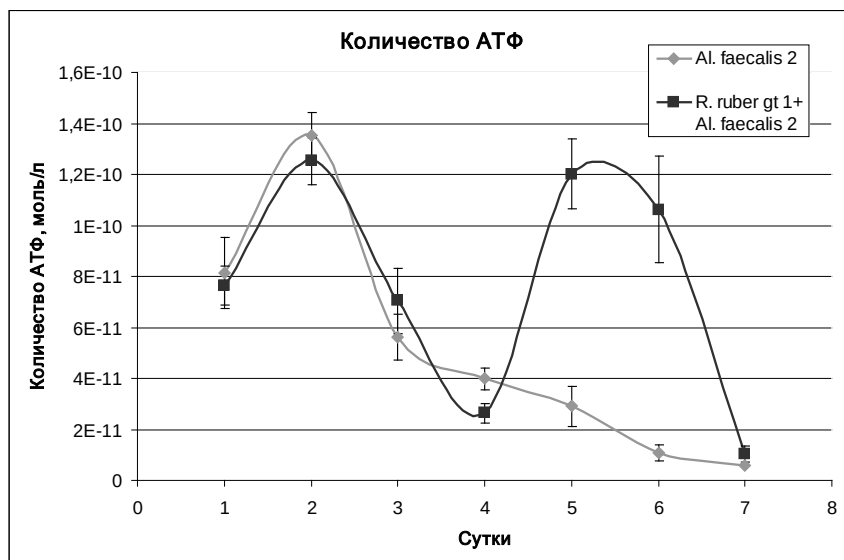


Рисунок 2 – Энергетический статус клеток *Al. faecalis* 2 и смешанной культуры

Заключение. Комплексная оценка динамики роста показала, что культура *Al. faecalis* 2 хорошо образует биопленки, особенно на начальных этапах прикрепления и формирования, за счет высокой адгезивной способности и высокого производства полимерного матрикса, тогда как культура *R. ruber* gt 1 выступает в качестве микроорганизма-спутника. Для применения данных штаммов в промышленной очистке сточных вод наилучшим образом подходит биокатализатор на основе биопленки смешанной культуры этих микроорганизмов.

Литература

1. M. Hassanpourfard, X. Sun, A. Valiei, P. P. Mukherjee, T. Thundat, Y. Liu, A. Kumar. Protocol for biofilm streamer formation in a microfluidic device with micro-pillars// Journal of Visualized Experiments. – 2014. №90. doi: 10.3791/51732.
2. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: КолосС, 2004. С. 227.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Д.А. Шевчук, К.В. Пшеорская

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

E-mail: shevchuk.95@mail.ru

Загрязнение природной среды нефтью и сопутствующими загрязнителями – острейшая экологическая проблема во многих регионах России, в том числе и в Красноярском крае. Негативное воздействие нефтедобычи обусловлено как непосредственной деградацией почвенного покрова на участках разлива нефти, так и воздействием ее компонентов на сопредельные среды, вследствие чего продукты трансформации нефти обнаруживаются в различных объектах биосферы. Одним из решений проблемы утилизации нефтяных загрязнений является применение биологических объектов, способных использовать в качестве субстрата углеводороды. Одним из наиболее эффективных и экологически безопасных методов очистки окружающей среды от углеводородов является биоремедиация. В почве углеводороды разлагаются в результате деятельности углеводородокисляющих микроорганизмов до углекислого газа и воды или трансформируются в соединения, доступные для утилизации другим микроорганизмам [1,2].

Известно, что бактерии играют решающую роль в самоочищении почвы от загрязнения углеводородами нефти, однако высокие концентрации нефтепродуктов могут ингибировать рост микрофлоры и подавлять процессы самоочищения, поэтому целью данной работы было исследование микрофлоры образцов почв с территории АЗС г. Красноярска.

Цель и задачи исследования: 1) оценить количество эколого-трофических групп бактерий и микромицетов в почве на разном расстоянии от источника загрязнения (сливного колодца); 2) исследовать таксономическое разнообразие микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах.

Материалы и методы. В работе использовали общепринятые методы почвенной микробиологии. Общую численность микроорганизмов определяли на агаризованных питательных средах: аммонификаторы – на мясопептонном агаре, прототрофы – на крахмало-аммиачном агаре, аэробные азотфиксаторы – на среде Эшби, микромицеты – на среде Сабуро. Изучение фенотипических признаков чистых культур почвенных микроорганизмов проводили стандартными микробиологическими методами.

Результаты. Исследования показали, что численность всех исследованных эколого-трофических групп бактерий в образцах почв АЗС, загрязненных нефтепродуктами, вблизи сливного колодца (1 м) была снижена в 4,5-150 раз в сравнении с контрольным незагрязненным участком почвы. Наибольшее негативное влияние углеводороды оказали на рост микромицетов. Также было показано, что с удалением от источника загрязнения (5 м) отмечено стимулирующее действие нефтепродуктов на рост бактерий. Из загрязненной нефтепродуктами почвы было выделено 20 штаммов бактерий. Доминирующие виды бактерий принадлежали к следующим родам: *Pseudomonas* (20 %), *Bacillus* (15 %) и

Arthrobacter (13 %). Представители данных родов обладают потенциальной способностью к окислению углеводов, таким образом, выделенные штаммы можно рекомендовать для биоремедиации почв АЗС, загрязненных нефтепродуктами.

Литература

1. Халимов, Э.Н. Экологические и микробиологические аспекты повреждающего действия нефти на свойства почвы/ Э.Н. Халимов, С.В. Левин, В.С. Гузев // Вестник МГУ, 1996. – Сер. 17. – № 2. – С. 59-64.

2. Гоголева, О.А. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем / О.А. Гоголева, Н.В. Немцева // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2012. – № 2. – С. 1-7.

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВ В РАЙОНЕ МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО КОМБИНАТА «КАРАБАШМЕДЬ»

Т.В. Бауэр¹, Д.Г. Невидомская¹, Т.М. Минкина¹, С.С. Манджиева¹, В.Г. Линник²

¹Южный федеральный университет, 344090, г. Ростов-на-Дону, Россия

²Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, 117975,
г. Москва, Россия

E-mail: bauertatjana@mail.ru

К числу предприятий, которые наносят максимальный урон окружающей среде, относятся медеплавильные комбинаты, среди которых расположенный на Южном Урале комбинат «Карабашмедь». Экологическая ситуация в регионе, возникшая в результате более чем 100-летней деятельности комбината, остается крайне сложной: на окружающей территории площадью 30 км² сформировалась природно-техногенная зона, в которой содержание ряда металлов (Cu, Zn, Pb, Cu и Ni) и As многократно превышает кларки литосферы. Длительная эксплуатация комбината привела к деградации естественных почв и формированию техногенно-нарушенных хемоземов с высоким уровнем загрязнения.

Цель работы - изучение форм соединений Cu в хемоземах, прилегающих к медеплавильному комбинату «Карабашмедь».

Материалы и методы. В ходе изучения современной геоэкологической обстановки в окрестностях г. Карабаш в 2012 г. было заложено 4 площадки мониторинга в зоне техногенного бедленда. Общим для выбранных участков мониторинга является то, что верхние органогенные горизонты почв, включая подстилку, полностью уничтожены. Материнская порода начинается непосредственно с поверхности.

Отбор почвенных образцов для физико-химических анализов и их последующую камеральную обработку выполняли по методике почвенного института им. Докучаева [1]. Состав соединений Cu в техногенно-нарушенных почвах определяли методом последовательного фракционирования, предложенным Tessier с соавторами. [2].

Результаты. Хемоземы характеризуются следующими физико-химическими свойствами: C_{орг} – 0,4-0,6%; pH – 3,9-4,4; физ. глина – 24,6-2,5%; ил – 0,0-0,01%; CaCO₃ – 0,8-1,3%; MgCO₃ – 0,2-0,4%. Валовое содержание Cu в поверхностном слое (0-5 см) варьировало от 214,2 до 1066,9 мг/кг (кларк Cu по А.П. Виноградову (1967) – 47 мг/кг).

Результаты фракционного состава Cu в хемоземах показали преобладание обменной фракции, на долю которой приходится от 39% до 44% от общего содержания металла. Высокая подвижность Cu связана не только с очень высоким содержанием ее в почве, но с кислой (рН 4.4) (площадка Т4) и сильнокислой (рН 3.9) (площадка Т1) реакцией среды,

которая способствует увеличению мобильности металла в почвах. Фракция, связанная с карбонатами, является самой низкой и не превышает 2% в исследуемых хемоземах, так как присутствие карбонатов обеспечивается не природным, а аутигенным минералообразованием. Доля Cu, связанная с органическим веществом, варьирует от 21 (T4) до 34% (T1). Оргонофильность Cu в условиях низкого содержания органического вещества в почве четко проявляется при валовом содержании металла около 350 мг/кг. Увеличение содержания Cu в почве (более 1000 мг/кг) способствует формированию растворимых комплексов с органическим веществом, что приводит к большему увеличению обменной фракции металла по сравнению с возрастанием фракции металла, связанной с органическим веществом. Доля Cu, связанная с Fe-Mn (гидро)оксидами, возрастает с увеличением уровня загрязнения и составляет 4-17% от общего содержания в почвах. Медь, идентифицируемая в остаточной фракции, занимает четвертое место после обменной, и связанной с органическим веществом и Fe-Mn (гидро)оксидами фракций.

Заключение. Установлено, что в исследованных техногенно-нарушенных почвах, прилегающих к Карабашскому медеплавильному комбинату, содержание Cu превышает кларк литосферы в десятки раз. Накопление Cu происходит в наиболее подвижных обменных формах, которое возрастает с повышением техногенной нагрузки на почву. Закрепление металла происходит преимущественно за счет фиксации органическим веществом.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации № 5.948.2017/ПЧ и Российского фонда фундаментальных исследований № 16-34-00573.

Литература

1. ГОСТ 17.4.3.01-83. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. Москва. ИПК Издательство Стандартов, 2004. - 4 с.
2. Tessier, A. Sequential extraction procedure for the speciation of the particulate trace metals [Text] / A. Tessier, P.G.O. Campbell, M. Bisson // Analytical Chemistry. - 1979. - V. 51. - P. 844-851.

ФОРМЫ НАХОЖДЕНИЯ ZN И CU В ПОЧВАХ РАЙОНА ПРИРОДНОГО ОТСТОЙНИКА ХИМИЧЕСКОГО ЗАВОДА ДОЛИНЫ РЕКИ СЕВЕРСКИЙ ДОНЕЦ

Д.Г. Невидомская, Т.В. Бауэр, Т.М. Минкина, К.Р. Уразгильдиева, М.В. Бурачевская

*Южный федеральный университет, 344090, г. Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1,
Россия*

E-mail: dnevidomskaya@mail.ru

Город Каменск-Шахтинский Ростовской области (Россия) является примером, когда многолетняя антропогенная деятельность негативно сказывается на прилегающих наземных и водных экосистемах. Строительство крупного промышленного центра с химическими заводами и производствами в городе в 50-х годах прошлого века привело к тому, что в долине р. Северский Донец были размещены пруды-отстойники и шламонакопители. Для этих целей использовали естественные озера в пойме р. Северский Донец.

Цель работы – изучение аккумуляции и трансформации Zn и Cu в высокозагрязненных техногенно-трансформированных почвах, особенностей их взаимосвязи с компонентами оргоно-минеральной матрицы почв района природного отстойника озера Атаманского.

Материалы и методы. Для изучения свойств и особенностей содержания и форм соединений металлов в 2016 году были выполнены литохимические опробования территории, прилегающей к озеру Атаманское, расположенному в пойме р.Северский Донец. Были заложены площадки мониторинга. Образцы техногенно-трансформированных почв, согласно классификации и диагностики почв России [2], относятся к Хемоземам. Были определены основные физико-химические свойства почв. Оценку почвенно-геохимического состояния проводили по величине валового содержания химических элементов в почвах. Валовое содержание Cr, Ni, Mn, Zn, Cu, Pb в почвах определяли рентген-флюоресцентным методом на спектрокане МАКС-GV. Состав соединений Zn и Cu в почвах определяли методом последовательного фракционирования, предложенным Tessier соавторами [7].

Результаты. Хемоземы характеризуются следующими физико-химическими свойствами: $C_{орг}$ – 4,3-8,1%; pH – 7,8-7,9; физ. глина – 18,3-64,1%; ил – 0,2-25,0%; $CaCO_3$ – 3,8-7,8%; $MgCO_3$ – 0,5-0,8%. Валовое содержание металлов в поверхностном слое (0-5 см) варьировало: Cr – 142,0-154,1 мг/кг (кларк Cr по А.П. Виноградову [1] – 83 мг/кг), Ni – 52,1-152,4 мг/кг (кларк Ni – 58 мг/кг), Mn – 217,1-1167,4 мг/кг (кларк Mn – 1000 мг/кг), Zn – 3672,5-66075 (кларк Zn – 83 мг/кг), Cu – 49,5-576,8 мг/кг (кларк Cu – 47 мг/кг), Pb – 223,4-1591,2 мг/кг (кларк Pb – 16 мг/кг), Cd – 0,09-10,6 (кларк Cd – 0,13 мг/кг). Минералогический состав хемоземов представлен следующими компонентами (в %): ильменит – 12, гидроокислы Fe – 20, пирит, марказит – 8,0; сульфаты – 60,0.

Показано, что наибольшая доля Zn закрепляется в остаточной фракции, до 49 % от общего содержания (таблица). Поскольку глинистые минералы обладают высокой сорбционной способностью по отношению к Zn [5], наряду с остаточной фракцией, отмечается закрепление Zn фракцией гидроксидов Fe и Mn (от 22 до 31%). Высокая степень сродства Zn к реакционным центрам железистых минералов с ростом техногенного загрязнения отмечалась во многих работах [3, 4, 6]. Установлено, что на долю фракции, связанной с органическим веществом, приходится от 6 до 13% (таблица). Незначительная роль органического вещества почвы в фиксации Zn связана с его наибольшим сродством к железистым минералам.

Таблица – Фракционный состав соединений Zn и Cu в техногенных почвах района озера Атаманского промзоны г. Каменск-Шахтинский Ростовская область, в мг/кг

№ площадки мониторинга	Фракции					Общее содержание
	Обменные	Связанные с карбонатами	Связанные с (гидр) оксидами Fe и Mn	Связанные с органическим веществом	Связанные с силикатами (остаток)	
Zn						
Незагрязненная почва	0.8	1.8	11.0	3.2	27.3	44.1±3.9
ДЗ	6867.2±786.0	3456.8±6.9	15039.4±1053.4	8540.2±1890.1	32172.0±3110.7	66075.4±7095.0
Д4	8254.3±900.9	4578.9±399.0	15421.6±1570.3	7580.9±1325.6	28196.4±3948.5	62032.1±5903.0
Cu						
Незагрязненная почва	0.1	0.2	2.1	6.8	8.2	17.4
ДЗ	33.1±0.2	17.1±18.5	37.8±4.7	219.0±28.4	269.8	576.8±40.5
Д4	17.5±0.3	10.3±3.4	21.1±1.5	95.2±9.8	171.5	315.6±19.0

Фракционирование Cu в техногенных почвах выявило высокую степень закрепления металла с органическим веществом. Несмотря на высокое сродство Cu с органическим веществом, содержание металла в остаточной фракции было доминирующим. Так, при высоком валовом содержании Cu в почве площадок мониторинга доля остаточной фракции металла увеличивается на фоне долговременного перманентного загрязнения. Аналогичные закономерности увеличения доли наиболее консервативной остаточной фракции металлов с ростом техногенного загрязнения почв отмечены в исследованиях [3, 4]. Процесс аккумуляции поступающих извне соединений металлов кристаллическими решетками глинистых минералов медленный, но из-за длительного периода загрязнения он становится доминирующим.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что во всех исследуемых почвах наблюдается полиэлементное загрязнение, превышения кларков литосферы по Zn в сотни раз, по Cd и Pb в десятки раз; для Cu, Ni, Cr и Mn отмечено превышение в несколько раз. Выявлены формы нахождения Zn и Cu в исследуемых почвенных образцах. Щелочная реакция среды в исследуемых почвах нивелирует подвижность металлов и ограничивает экологические риски для биологического поглощения. Основными стабилизаторами подвижности металлов выступают филлосиликаты.

Работа выполнена при поддержке РНФ № 16-14-10217.

Литература

1. Виноградов, А.П. Геохимия редких и рассеянных химических элементов в почвах / А.П. Виноградов. – М.: Изд-во АН СССР, 1957. – 237 с.
2. Классификация и диагностика почв России/ Авторы и составители: Л.Л. Шишов, В.Д.Тонконогов, И.И.Лебедева, М.И. Герасимова. – Смоленск: Ойкумена, 2004. – 342 с.
3. Минкина, Т.М. Состав соединений тяжелых металлов в почвах / Т.М.Минкина, Г.В. Мотузова, О.Г.Назаренко. – Ростов-на-Дону: Изд-во «Эверест», 2009. – 208 с.
4. Минкина, Т.М. Трансформация соединений тяжелых металлов в почвах степной зоны/ Т.М.Минкина, Г.В.Мотузова. О.Г.Назаренко, В.С.Крыщенко, С.С.Манджиева // Почвоведение. –2008. –№ 7. –С. 810-818.
5. Jacquat, O. Soil properties controlling Zn speciation and fractionation in contaminated soils / Jacquat, O., A.Voegelin, R.Kretzschmar. // Geochimica et Cosmochimica Acta. –2009. –Vol. 73. –P. 5256-5272.
6. Nannoni, F. Fractionation and geochemical mobility of heavy elements in soils of a mining area in northern Kosovo / F.Nannoni, G.,Protano, F.Riccobono// Geoderma. –2011. –V. 16. –P. 63-73.
7. Tessier, A. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals / A. Tessier, P.G.C. Campbell, M. Bisson// Analytical Chemistry. – 1979. – Vol. 51. – P. 844-850.

BIO-ASSAY GUIDED FRACTIONATION OF ANTIMICROBIAL METABOLITE DDQ FROM ENDOSYMBIONT *PSEUDOMONAS VERONII* AS 41G INHABITING *ANNONA SQUAMOSA* L.

Syed Baker¹, Nagendra Prasad²

¹Herbal Drug Technological Laboratory, Department of Microbiology, Manasagangotri,
University of Mysore, India

²Department of Biotechnology, Sri Jayachamarajendra College of Engineering, JSS Science and
Technology University, Technical Institutional Campus, Mysore 570006, India

E-mail: syedbaker3@gmail.com

The present study reports bioassay guided fractionation of antimicrobial metabolite 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) secreted from novel endosymbiont *Pseudomonas veronii* AS 41G inhabiting *Annona squamosa* L. The endosymbiont was subjected to large scale fermentation to produce antimicrobial metabolite. The supernatant was subjected to solvent extraction using ethyl acetate as solvent to obtain organic phase which was reduced under vacuum at 40° C to obtained crude metabolites. The crude metabolites was purified using fractionation techniques such as Thin Layer Chromatography (TLC) which displayed active metabolite with intense band at R_f 0.5. Further column chromatography revealed elution of active metabolites between 12.5 to 16 % ethyl acetate and High-performance liquid chromatography (HPLC) depicted active fraction eluting between retention time (t_R) 6-8 minutes. The purified metabolite bearing activity was characterized using spectroscopic techniques viz., Liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) to reveal its molecular mass $m/z=227.19$ (M+H) in positive mode. Further presence of functional group was depicted with Nuclear magnetic resonance (NMR) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results ascertained with the characterization techniques was surveyed and matched in chemical library to reveal close affinity of antimicrobial metabolite to benzoquinone derivative as DDQ with molecular formula $C_8Cl_2N_2O_2$. The characterized DDQ displayed activity against panel of human and phytopathogens via disc diffusion and minimal inhibitory concentration assays which resulted in significant activity against all the test pathogens. Among the test pathogens, significant antibacterial activity was observed against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* compared to standard gentamicin. Moderate zone of inhibition was observed against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Shigella flexneri*. Antifungal activity of DDQ displayed significant activity against test species of *Aspergillus* and *Fusarium* at 10 mg/ml concentration with significant antifungal activity conferring against *Fusarium lateritium* followed by moderate activity against *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani* and least activity against rest of the test pathogens such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium verticillioides* which was compared and interpreted with standard bavistin. The bioautography assay revealed the bioactive fraction at R_f 0.5 with activity. To best of our knowledge the present finding is the first report on DDQ from any endophytes.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У C_3 И C_4 РАСТЕНИЙ НА РАЗЛИЧНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ СОСТАВ СВЕТОВОЙ ЭНЕРГИИ У СВЕТОДИОДНЫХ ОБЛУЧАТЕЛЕЙ

Н.А. Гаевский, А.Ф. Валиулина, А.И. Юнусова

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

E-mail: nikgna@gmail.com

Светофизиология растений – одно из направлений современной биотехнологии растений – ставит своей целью разработку световых режимов выращивания растений, при которых увеличение продукции целевых продуктов (биологически активных веществ) сочетается с экономным расходованием световой энергии. Теоретической основой этого направления стали работы ученых 20 века, установивших основные реакции растений на действия света различного спектрального состава, в которых рецепторы световых сигналов образуют сложную полихроматическую систему фоторегуляции [1].

Снижение энэргозатрат при выращивании растений происходит при внедрении в светокультуру светоизлучающих диодов (СИД) с высокой долей энергии света в области фотосинтетически активной радиации (400-700 нм). Дополнительная экономия может быть получена при условии, что в квантовом спектре преобладают красные лучи, которые поглощает хлорофилл. Однако увеличение доли красного света снижает долю синего, зеленого и дальнего красного света, что может стать причиной нарушений фотоморфогенеза.

Цель работы – исследование фотосинтетического аппарата C_3 и C_4 растений, выращенных при освещении СИД «белого» и «красного» света (15 Вт, ООО «СибИТЦ», г. Красноярск, рисунок).

Материалы и методы. Световой поток ($\text{мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) в области ФАР на уровне листьев составлял для «красного» источника 233, для белого источника – 222.

C_3 растения: овес (*Avena sativa*); пшеница (*Triticum aestivum*); ячмень (*Hordeum vulgare*); кабачок (*Cucurbita pepo*), подсолнечник (*Heliánthus ánnuus*), огурец (*Cucumis sativus*) томат (*Solánum lycopérsicum*). C_4 растения: кукуруза (*Zea mays*); просо (*Panicum miliaceum*); суданская трава (*Sorghum × drummondii*); щирица (*Amaranthus retroflexus*).

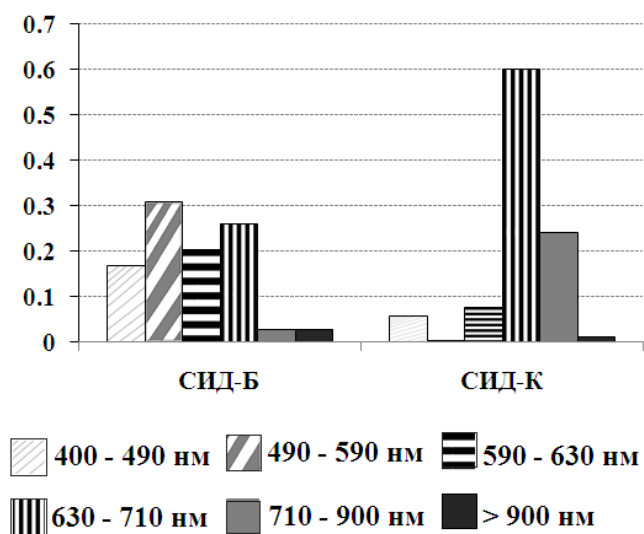


Рисунок – Распределение светового потока, испускаемого «белым» (СИД-Б) и «красным» (СИД-К), в видимой и ИК-областях спектра

Растения выращивали в изолированных от дневного света боксах (30 дм³). Однодольные растения были выращены на керамзите с добавлением питательного раствора по Хогланду в разведении 1:10; двудольные – в почве с 70% увлажнением. В течение 2-3

недель (до появления второго настоящего листа) поддерживали фотопериод – 9 ч. Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом, активность фотосинтеза – на основе регистрации флуоресценции хлорофилла на приборе IMAGING-PAM M-Series (WALZ, Германия) в режиме регистрации световой кривой (rapid light curve).

Результаты исследования фотосинтетических пигментов и фотосинтетической активности вторых настоящих листьев у C_3 и C_4 растений, выращенных на «белом» и «красном» света, показаны в табл. 1 и табл. 2, соответственно.

Таблица 1 – Фотосинтетические пигменты вторых настоящих листьев C_3 и C_4 растений, выращенных при облучении «белым» (WL) и «красным» (RL) светом

Класс	Вид	Chl <i>a</i> , mg/dm ²		Ch. <i>a</i> /Ch. <i>b</i>		Ch(<i>a</i> + <i>b</i>)/Car	
		WL	RL	WL	RL	WL	RL
C_3 -dicots	<i>Heliánthus ánnuus</i>	1.15±0.23	1.08±0.10	3.0±0.2	2.3±0.01	3.4±0.0	3.4±0.1
	<i>Solánum lycopérsicum</i>	1.90±0.05	0.71±0.10	2.6±0.1	1.8±0.0	3.8±0.8	3.2±0.0
	<i>Cucumis sativus</i>	1.59±0.10	0.21±0.05	3.1±0.1	2.0±0.1	3.5±0.2	3.3±0.2
	<i>Cucúrbita pépo</i>	1.40±0.10	0.08±0.03	2.7±0.0	0.7±0.2	3.6±0.0	1.0±0.1
C_3 -monocots	<i>Avena sativa</i>	1.31±0.14	1.36±0.25	2.5±0.1	2.7±0.1	3.8±0.1	3.5±0.1
	<i>Tríticum aestívum</i>	1.48±0.16	1.46±0.21	2.7±0.1	2.6±0.1	3.9±0.0	3.6±0.0
	<i>Hordeum vulgare</i>	1.53±0.20	1.36±0.11	2.5±0.1	2.7±0.1	3.8±0.0	3.5±0.0
C_4 -dicots	<i>Amaranthus retroflexus</i>	1.49±0.00	0.61±0.04	2.8±0.2	2.1±0.1	3.4±0.2	2.7±0.2
C_4 -monocots	<i>Panicum miliaceum</i>	1.18±0.24	0.75±0.02	3.7±0.2	3.2±0.0	3.6±0.0	3.7±0.1
	<i>Zea mays</i>	1.22±0.09	1.20±0.03	3.5±0.1	3.5±0.1	3.7±0.0	3.5±0.0
	<i>Sorghum × drummondii</i>	2.73±0.15	2.12±0.11	3.4±0.0	3.2±0.1	4.3±0.1	3.9±0.1

Таблица 2 – Фотосинтетические показатели у вторых настоящих листьев C_3 и C_4 растений, выращенных при облучении «белым» (WL) и «красным» (RL) светом

Класс	Вид	Y(II) max		Y(NPQ)		ETRmax	
		WL	RL	WL	RL	WL	RL
C_3 -dicots	<i>Heliánthus ánnuus</i>	0.56±0.02	0.48±0.05	0.6±0.01	0.47±0.02	24.1±6.1	1,0±0.4
	<i>Solánum lycopérsicum</i>	0.74±0.01	0.16±0.11	0.59±0.06	0.22±0.05	19.7±5.3	0
	<i>Cucumis sativus</i>	0.75±0.01	0.01±0,00	0.64±0.12	0.25±0.03	33.3±8.9	0
	<i>Cucúrbita pépo</i>	0.75±0.01	0.22±	0.58±0.05	0.41±0.08	18.7±1.6	0
C_3 -monocots	<i>Avena sativa</i>	0.64±0.09	0.7±0.2	0.51±0.06	0.48±0.07	16.9±3,0	2.7±1.6
	<i>Tríticum aestívum</i>	0.74±0.01	0.66±0.06	0.54±0.15	0.36±0.16	20.3±0.4	2.3±0.5
	<i>Hordeum vulgare</i>	0.74±0.04	0.67±0.08	0.49±0.03	0.39±0.04	19.1±1.8	5.9±2.7
C_4 -dicots	<i>Amaranthus retroflexus</i>	0.76±0.01	0.53±0.05	0.61±0.04	0.74±0.05	29.1±1.5	4.2±0.3
C_4 -monocots	<i>Panicum miliaceum</i>	0.68±0.01	0.68±0.01	0.60±0.01	0.54±0.01	3.6±0.4	3.5±0.2
	<i>Zea mays</i>	0.70±0.01	0.68±0.01	0.56±0.01	0.55±0.01	20.3±2.5	17.4±0.9
	<i>Sorghum × drummondii</i>	0.76±0.01	0.67±0.02	0.49±0.01	0.40±0.08	2.3±0.1	1.1±0.5

Все исследованные виды C_3 и C_4 растений в той или иной степени реагировали на изменение спектрального состава света. Размерные показатели листьев у однодольных C_3 и C_4 растений не зависели от качественного состава света. Виды C_3 и C_4 двудольных на «красном» свету отставали в росте и в зависимости от вида растения имели отклонения от нормы: подсолнечник формировал длинный гипокотиль и короткое междоузлие между семядолями и первыми листьями, первые настоящие листья у томата и кабачка были мелкими. Дефицит зеленых и желтых пигментов наблюдали у всех изученных видов двудольных C_3 растений. Особенно сильно это проявилось у кабачка и огурца, образовавших этиолированные листья. Фотосинтетическая активность всех растений, выращенных на «красном» свету, заметно уступала растениям, выращенным на белом свету. Скорость фотосинтетического транспорта электронов в условиях светового насыщения оказалась наиболее объективным показателем для выявления индивидуальных реакций растений на качественный состав света.

Заключение. На основе сравнения влияния «красного» и «белого» света на морфологические, ростовые показатели и на фотосинтетическую активность у ряда растений с C_3 и C_4 -типом метаболизма, выявили ряд особо чувствительных растений к «красному» свету. По возрастающей разнице между растениями, выращенными на «белом» и «красном» свету, исследованные виды распределились в следующем порядке: C_4 однодольные (просо → кукуруза → сорго) => C_3 однодольные (ячмень → пшеница → овес) и C_4 двудольные (амарант) => C_3 двудольные (подсолнух → томат → кабачок).

Литература

Головацкая И.Ф. Морфогенез растений и его регуляция. Часть 1: Фоторегуляция морфогенеза растений: учеб. пособие. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2016. – 172 с.

ВЛИЯНИЕ ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ ШТАММА УОЗК2 И ВДР5М НА МИКРОФЛОРУ ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЫ *ZEa mays*

Т.И. Голованова, Ю.С. Морозова

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, пр. Свободный 79, г. Красноярск, 660041

E-mail: tigolovanova@mail.ru

Воздействие микроорганизмов может сказываться как отрицательно, так и положительно на ростовые процессы растений и на их восприимчивость к различному роду болезням. Положительное действие основано на антагонистическом свойстве микроорганизмов. Они способны образовывать связи с корнями растений и оказывать не только защитный эффект, но и стимулировать рост и развитие растения. К таким микроорганизмам относятся психротолерантные бактерии, выделенные из карстовых пещер Красноярска. Препараты, полученные на их основе, безопасны для человека и животных. Это является их отличительной особенностью от других способов защиты растений. Изучение взаимодействия микроорганизмов-антагонистов патогенов и растений в настоящее время представляет большой научный интерес и особенно актуально в связи с возможностью альтернативной замены пестицидов на вещества биологической природы [1].

Цель исследований – изучение влияния психротолерантных пещерных бактерий, выделенных из карстовых пещер Красноярска, на микрофлору прикорневой зоны растений и морфо-физиологические показатели растений *Zea mays*.

Материалы и методы. Исследовали растения кукурузы гибрид «Кубанский сахарный 210» (производитель семян фирма «Евросемена»); психротолерантные бактерии штаммов ВДР5м и УОЗК2, выделенные из карстовых пещер Красноярска. В качестве контроля использовали растения, семена которых не обработаны микроорганизмами; опыта – растения, семена которых подверглись обработке психротолерантными бактериями штамма УОЗК2 или ВДР5м.

Для выращивания растений использовали почвенный субстрат, включающий: верховой и низовой торф, песок и доломитовую муку (рН 5.5-6.5; N – 30%; P – 30%; K – 40%). Выращивание проводили при естественном освещении, интенсивность освещения составляла 14 клюкс. Влажность – 74-77 %, температура колебалась в пределах 26-30 °C. Растения поливали водопроводной отстоянной водой, поддерживая относительную влажность почвы на уровне 60%.

В ходе эксперимента определяли энергию прорастания, всхожесть семян в соответствии с ГОСТ 12038-84 [2], длину надземной и корневой систем, сырую и сухую биомассу надземной и корневой систем. Содержание зеленых пигментов определяли спектрофотометрическим методом по молярным коэффициентам экстинкции.

Определение оптической плотности экстракта осуществляли на спектрофотометре (SPECOL), обладающем достаточной разрешающей способностью.

Концентрацию пигментов рассчитывали по формулам [3]:

$$C_a = (13,7 \times (D_{665} - D_{720}) - (5,7 \times (D_{649} - D_{720})))$$

$$C_b = (25,8 \times (D_{649} - D_{720}) - (7,6 \times (D_{665} - D_{720}))),$$

где концентрации C_a – концентрация хлорофилла *a* (мкг/мл), C_b – концентрация хлорофилла *b* (мкг/мл), *D* – оптическая плотность раствора при заданной длине волны.

Для анализа ризосферной микрофлоры использовали смывы с корней. Расчет проводили по следующей формуле:

$$KOE = \frac{N_i \times k}{M \times V}$$

где N_i – сумма колоний в чашке Петри; *k* – разведение; *M* – влажность воздуха в отн. ед.; *V* – объем капли в мл.

Для статистической обработки экспериментальных результатов использовали специализированный пакет программы Microsoft Excel 2007. Оценку достоверности различий средних проводили на основе критерия Стьюдента, при уровне вероятности не менее 95 %. Достоверность действия фактора проводили с использованием дисперсионного анализа. В таблицах и рисунках приведены средние арифметические значения с двухсторонним доверительным интервалом из 3-5 независимых экспериментов, каждый из которых проведен в 3 биологических повторностях.

Результаты. Обнаружен стимулирующий эффект штаммов УОЗК2 и ВДР5м уже на ранних этапах развития растения *Zea mays*. Показано, что штаммы УОЗК2 и ВДР5м оказывали положительное влияние на энергию прорастания семян. Положительный эффект исследуемых штаммов был обнаружен и на развитии coleoptилей *Zea mays*, где степень влияния штамма УОЗК2 превышала степень влияния штамма ВДР5м по сравнению с контрольным вариантом. По результатам морфофизиологического анализа установлено, что психротолерантные бактерии (УОЗК2, ВДР5м) оказывали влияние на ростовые процессы растений *Zea mays*. На всех сроках вегетации наблюдали наибольшее положительное влияние штамма УОЗК2 на все исследуемые морфофизиологические и биохимические показатели растений кукурузы: длину надземной и корневой систем, на накопление сырой и сухой биомассы, на накопление зеленых пигментов, причем наибольший стимулирующий эффект штамма УОЗК2 проявлялся на более поздних стадиях развития растений.

Бактеризация семян растений штаммами ВДР5м и УОЗК2 привела к статистически значимым ($p < 0.001$) изменениям в структуре ризосферного микробного комплекса. На третьи сутки вегетации в контрольном варианте на долю гетеротрофных микроорганизмов приходилось 14%, азотфиксаторов – 25%, аммонифицирующих микроорганизмов – 90%, а олиготрофных микроорганизмов – 1%. Под влиянием психротолерантов изменялся количественный состав микроорганизмов в прикорневой зоне растений. Под действием ВДР5м происходило увеличение гетеротрофных микроорганизмов азотфиксаторов и олиготрофов, но резко снижалось содержание аммонификаторов. Эффект действия УОЗК2 был аналогичным, однако, степень его проявления была значительно выше, чем у штамма ВДР5м. На десятые сутки вегетации растений количественный состав групп микроорганизмов в структуре микробного комплекса прикорневой зоны кукурузы существенно изменился. Под действием штамма ВДР5м содержание гетеротрофных и аммонифицирующих микроорганизмов не изменялось, но резко снижалось количество азотофиксирующих и олиготрофных микроорганизмов; под влиянием штамма УОЗК2, происходило резкое снижение гетеротрофных, аммонифицирующих и олиготрофных микроорганизмов, но увеличивалось содержание азотфиксаторов. Это очень важно для растения, так как они не усваивают атмосферный азот, а снабжение азотом происходит за счет работы аммонифицирующих микроорганизмов.

Заключение. Показано положительное влияние психротолерантных бактерий штаммов ВДР5м и УОЗК2 на рост и развитие растений и на структуру почвенных бактериальных комплексов. Наибольший эффект на растения *Zea mays* оказал штамм УОЗК2.

Литература

1. Ланкина, Е.П. Перспективы использования смешанных культур психрофильных и психротолерантных бактерий в биологической защите растений от болезней / Е.П. Ланкина, С.В. Хижняк, С.П. Кулижский // Вестник красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – №4. – С. 101-106.
2. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – Взамен ГОСТ 12038-66; введ. 1.07.86. – Москва: Изд-во стандартиформ, 2011. – С. 45.
3. Wintermans, J. F.G.M., Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol / J. F.G.M. Wintermans, A. De Mots // Biochimica et Biophysica Acta. – 1965. – Vol. 109. – P.P. 448 – 453.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СНИЖЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ РАСТВОРОВ МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ РАСТВОРОВ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ

Т.А. Козлова¹, Н.А. Тихомирова², С.В. Трифонов^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, проспект Свободный 79, Красноярск, Россия

²Институт биофизики СО РАН, улица Академгородок 50/50, Красноярск Россия

E-mail: trifonov_sergei@inbox.ru

Совершение длительных исследовательских космических миссий с человеком на борту невозможно без жизненно необходимых ресурсов, таких как: воздух, вода и пища. Очевидно, что транспортировка данных продуктов при таких полетах не целесообразна, из-за её большой стоимости. Поэтому более рационально синтезировать все необходимые

ресурсы непосредственно на борту космического корабля. Синтез кислорода, растительной пищи и воды возможен при наличии биолого-технической системы жизнеобеспечения (БТСЖО), в которой данные вещества воспроизводятся в круговоротном массообменном процессе из органических отходов. Центральным средообразующим звеном при этом являются высшие растения. [1].

Одной из главных проблем создания БТСЖО является переработка органических отходов жизнедеятельности человека. Для решения данной проблемы в Институте Биофизики СО РАН был разработан метод «мокрого» сжигания [2]. Принципиальное строение реактора «мокрого» сжигания представлен на рисунке.

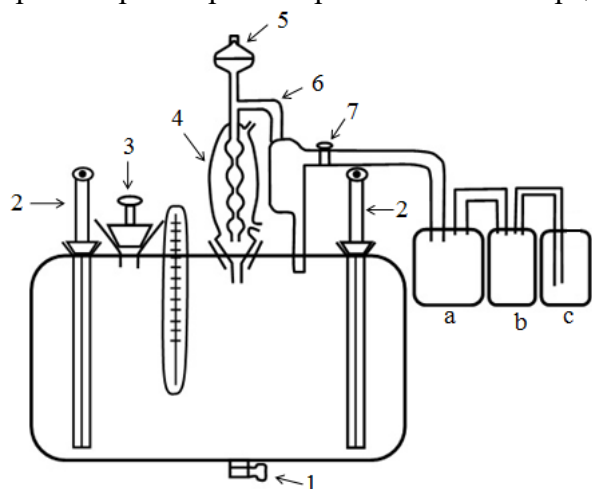


Рисунок – Строение реактора «мокрого» сжигания: 1 – сливной клапан; 2 – электроды; 3 – крышка для заливки перекиси и водорода; 4 – змеевик для охлаждения газов; 5 – мембрана для сбивания пены; 6 – ёмкость для сброса лишней пены; 7 – вентиль; 8 – платиновый катализатор для окисления водорода и летучих углеводородов; а, б – сосуды, предохраняющие от смешивания раствора из реактора и кислоты из сосуда сбора аммиака; с – сосуд для фиксации аммиака с 6%-ной азотной кислотой

В результате «мокрого» сжигания образуется полностью стерильный, минерализованный раствор, в составе которого сохраняются все макроэлементы с некоторой потерей азота в виде аммиака, и на котором возможно последующее выращивание растений. [3]

Использование раствора в течение нескольких дней после минерализации бывает проблематичным из-за его токсичности, что проявляется в снижении продуктивности первых двух-трех поколений конвейера пшеницы. Поэтому целью данной работы является разработка методики её снижения.

Материалы и методы. Для проведения экспериментов по снижению токсичности ирригационного раствора был выбран метод автоклавирования: питательный раствор нагревали при давлении 2,5 атм. и температуре 205⁰С в течение часа. Таким образом, было выбрано два варианта: автоклавированный и неавтоклавированный раствор. На полученных растворах, подвергшихся корректировке минерального состава, выращивали пшеницу методом гидропоники на нейтральном субстрате – керамзите. Также были проведены предварительные эксперименты по выращиванию *Chlorella vulgaris* в чашках петри на автоклавированных и неавтоклавированных минерализованных растворах, не подвергшихся коррекции минерального состава.

Полученные результаты. Эксперименты с пшеницей в настоящее время продолжаются, однако, предварительные опыты по выращиванию микроводорослей на полученном растворе свидетельствуют о снижении токсичности. Сухая масса водорослей выращенных на автоклавированном растворе примерно на 40 % выше, чем в варианте с неавтоклавированным раствором.

Закключение. Исходя из предварительных экспериментов по выращиванию микроводорослей, можно сделать вывод, что автоклавирование способствует снижению токсичности минерализованных отходов человека.

Литература

1. Замкнутая система: человек – высшие растения / под ред. Лисовского Г.М. – Новосибирск: Наука, 1979. – 160 с.
2. Способ утилизации отходов жизнедеятельности человека и несъедобной биомассы растений, приводящий к получению из них удобрений : пат. 2111939 РФ : МКИ 6 С 05 F 3/00 / Ю.А. Куденко, Р.А. Павленко ; заявитель и патентообладатель Ю.А. Куденко, Р.А. Павленко. – № 96114242/13 ; заявл. 10.07.96 ; опубл. 27.05.98, Бюл. № 15. – 4 с.
3. Трифонов, С.В. Минерализация органических отходов в среде перекиси водорода для повышения замкнутости биолого-технических систем жизнеобеспечения: дис. канд. биол. наук : 03.01.02 / Трифонов Сергей Викторович. – Красноярск, 2012. – 135 с.

Для заметок/ For notes

Для заметок/ For notes

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

II-я Международная научная конференция

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

II International scientific conference

**Красноярск
24–29 сентября 2017 г.**

Материалы конференции

*Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований и Правительства Красноярского края,
Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической
деятельности.*

Проект № 17-48-241009

Подписано в печать 01.09.2017 г.

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 9,8

Тираж 200 экз. Заказ 500

Отпечатано в типографии И.П. Дворядкина И.Д.

630036, Красноярск, Академгородок, 50/28, офис 156

тел. (391) 290-72-32