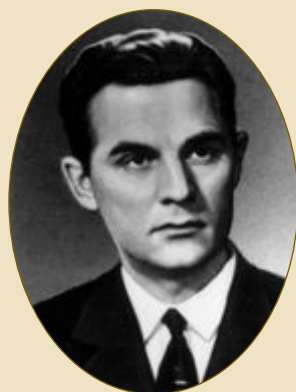


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

ВЕСТНИК
биотехнологии
и физико-химической
биологии
имени Ю.А. Овчинникова



Т. 9, № 1
2013

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
В.В. Зверев (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),
М.П. Кирпичников (Москва), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), А.Н. Панин (Москва), В.О. Попов (Москва),
А.Н. Решетилов (Пушино), К.Г. Скрыбин (Москва), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2013.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Селекция сообществ ацидохемолитотрофных микроорганизмов с высокой скоростью окисления
элементарной серы.

*Т.Ф. Кондратьева, Т.А. Пивоварова, И.А. Цаплина, А.Г. Булаев, М.И. Муравьев,
А.Е. Журавлева, Н.В. Григорьева, В.С. Меламуд, П.В. Мощанецкий*..... 5

Печень атлантических макруросов — сырье для производства пищевого рыбного жира.

Н.П. Боева, Е.В. Сергиенко, О.В. Бредихина, Ю.А. Баскакова 14

Молекулярная филогения и хемотаксономия экистероидсодержащих растений семейств *Caryophyllaceae*
Juss. и *Asteraceae Dumort.*

*В.В. Володин, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина, Ю.И. Друзь, С.О. Володина,
И.Ф. Чадин, Л. Дайнан*..... 21

Бактериально-клеточный реагент на основе белка А: технология получения и опыт использования.

О.Ю. Соснина, Е.А. Калашникова, Д.В. Грязнова, В.Н. Сперанская, А.М. Николаева..... 28

Исследование возможности флокуляции *Chlorella* sp. с использованием различных методов.

П.М. Готовцев, В.В. Бутылин, М.А. Ломоносова, В.А. Парабин..... 37

Растительно-микробные нутриенты. Сообщение 1: Селекция микроорганизмов-продуцентов биомассы
из биоценозов молока.

Чан Ван Ти, Л.А. Гулимова, Нгуен Чыонг Занг, К.В. Горин, Е.Г. Борисенко..... 44

Обзоры

Использование биодеструкторов для очистки территорий от нефти и нефтепродуктов: обзор.

В.А. Винокуров, Р.Г. Василев 51

Страницы истории

Место иммуногенетики в биомедицине.

Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев, Р.Г. Василев..... 58

Юбилейные и знаменательные даты 2013 года..... 70

Хроника

События 2013 года..... 73

Информация

Предстоящие мероприятия 2013 года 76

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Selection of communities of acidochemolithotrophic microorganisms with high oxidation rate of elemental sulfur.

T.F. Kondratieva, T.A. Pivovarova, I.A. Tsaplina, A.G. Bulaev, M.I. Muraviev, A.E. Zhuravleva, N.V. Grigorieva, V.S. Melamud, P.V. Moschanetsky..... 5

Liver Atlantic grenadier – raw material for the production of food fish oil.

N.P. Boeva, E.V. Sergienko, O.V. Bredihina, Y.A. Baskakova 14

Molecular phylogeny and chemotaxonomy of ecdysteroid-containing plants of the families Caryophyllaceae Juss. and Asteraceae Dumort.

V.V. Volodin, M.D. Shadrin, Y.I. Pylina, Y.I. Druz, S.O. Volodina, I.F. Chadin, L. Daynan 21

Bacterial cell-based protein A reagent: Production technology and experience in the use.

O.Y. Sosnina, E.A. Kalashnikova, D.V. Gryaznova, V.N. Speranskaya, A.M. Nikolaeva 28

Investigation of the possibility of flocculation *Chlorella* sp. using a variety of methods.

P.M. Gotovtsev, V.V. Butylin, M.A. Lomonosova, V.A. Parabin 37

Plant-microbe nutrients. Report 1: Selection of microbial biomass producers of milk biocenoses.

Tran Thi Van, L.A. Gulimova, Nguyen Truong Giang, K.V. Gorin, E.G. Borisenko 44

Reviews

Using biodestructors for cleaning up polluted areas of oil and petroleum products: a review.

V.A. Vinokurov, R.G. Vasilov 51

Pages of history

Immunogenetics place in biomedicine.

R.M. Khaitov, L.P. Alexeev, R.G. Vasilov 58

Anniversary and significant dates 2013 70

The chronicle

Events in 2013 73

The information

Forthcoming actions 2013 76

Rules for authors 78

К читателям

В первом номере журнала за 2013 год представлен ряд работ по разным темам, охватывающим проблемы биотехнологии и физико-химической биологии.

Профессор Т.Ф. Кондратьева с коллегами из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (Москва) экспериментально создали сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, обладающих большой скоростью роста и окисления серосодержащих субстратов, что решает преемственные задачи технологий рациональной утилизации зольно-шлаковых материалов.

Коллектив сотрудников ВНИРО (Боева Н.П. и др.) целенаправленно изучает ресурсную базу морской биотехнологии: они сообщают о данных, добытых в отношении использования сырьевых отходов макруруса для получения пищевого рыбного жира.

Профессор В.В. Володин и др. (Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар) исследовали связи между распространением экдистероидов в растениях и их филогенетической классификацией.

Пермские микробиологи (Николаева А.М. и др.) представили добротный материал — результаты своих последних исследований по разработке технологии получения бактериально-клеточного реагента на основе белка А, имеющего область практического применения в реакции коагулирования для производства иммунобиологических препаратов.

Профессор Е.Г. Борисенко с сотрудниками (Московский государственный университет пищевых производств) открывают серию публикаций, посвященных анализу потенциальных возможностей использования дрожжей из женского грудного молока в биотехнологическом производстве.

Академик РАН и РАМН Р.М. Хаитов, член-корреспондент РАМН Л.П. Алексеев и профессор Р.Г. Василев подготовили обзор о роли иммуногенетики в формировании современной биомедицины, который с интересом будет воспринят как иммунологами, так и широким кругом специалистов смежного профиля.

Профессора В.А. Винокуров (Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина) и Р.Г. Василев проанализировали в своем обзоре современные подходы к биоремедиации нефтяных загрязнений.

По традиции даны информационные материалы о знаменательных и юбилейных датах текущего года.

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

СЕЛЕКЦИЯ СООБЩЕСТВ АЦИДОХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВЫСОКОЙ СКОРОСТЬЮ ОКИСЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТНОЙ СЕРЫ

Т.Ф. КОНДРАТЬЕВА*, Т.А. ПИВОВАРОВА, И.А. ЦАПЛИНА, А.Г. БУЛАЕВ, М.И. МУРАВЬЕВ,
А.Е. ЖУРАВЛЕВА, Н.В. ГРИГОРЬЕВА, В.С. МЕЛАМУД, П.В. МОЩАНЕЦКИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт микробиологии
им. С. Н. Виноградского» РАН, Москва

Элементная сера является лучшим энергетическим субстратом, по сравнению с тиосульфатом и тетрациоанатом, для снижения значения рН культуральной жидкости аборигенного и экспериментально созданного сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Вследствие окисления элементной серы при 28 °С экспериментально созданное сообщество микроорганизмов снижало рН культуральной жидкости до более низкого значения (0,75), чем аборигенное, выделенное из промышленного биореактора при окислении флотоконцентрата сульфидной руды (0,98). Штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* ТФО, *A. thiooxidans* ОI-8, *A. caldus* ОП-1 и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* НТ-3 в процессе окисления элементной серы показали большую скорость снижения рН культуральной жидкости по сравнению с другими изученными штаммами *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus*. В результате адаптации сообщества микроорганизмов, созданного на основе экспериментального сообщества и вышеперечисленных штаммов, значение рН при окислении элементной серы за 6 сут. было снижено до 0,7 и 0,9 соответственно при 28 и 45 °С.

Ключевые слова: элементная сера, тиосульфат, тетрациоанат, ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы, сообщества микроорганизмов, значение рН, скорость роста, скорость окисления элементной серы.

Введение

Проблема использования отходов объектов тепло- и электрогенерации, в частности зольно-шлаковых материалов, образующихся при сжигании углей, не решена как в мире, так и в России. При сжигании углей образуются твердые отходы: зола уноса и шлак, которые перемещают в отвалы, где они складываются и хранятся на открытом воздухе или под слоем воды. В настоящее время в мире скопились в отвалах миллиарды тонн зольно-шлаковых материалов, которые создают большую экологическую напряженность в регионах объектов тепло- и электроэнергетики, представляют угрозу для окружающей среды и здоровья людей. В результате ветровой эрозии частицы

зола поступают в атмосферу и, оседая, загрязняют почву токсичными веществами. Под действием кислотных осадков происходит миграция токсических веществ из отвалов, приводящая к загрязнению почв, грунтовых вод, поверхностных вод. Оборудование и эксплуатация зольно-шлаковых отвалов требуют значительных затрат; кроме того, под них отчуждаются плодородные земли.

С точки зрения рационального природопользования зольно-шлаковые материалы представляют собой техногенное сырье, способное обеспечить многие нужды промышленности. Наибольшую ценность представляют благородные металлы (Au, Ag), микроэлементы (Sr, Ba, Ti, Zr, Ga, In, Tl, Ge, Sn, Pb и др.) и редкоземельные элементы (Sc, Y, La).

Из всего вышесказанного следует, что разработка энерго- и ресурсосберегающих комплексных технологий их утилизации и извлечения ценных компонентов является актуальной задачей.

Известна технология выщелачивания металлов из зольно-шлаковых отвалов растворами азотной, серной или соляной кислот в концентрации от 50 до 300 г/л при соотношении твердой и жидкой фаз от 1:3 до 1:10 и температуре от 18 до 90 °С [3]. Технология высокозатратна и экологически опасна.

© 2013 г. Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Цапина И.А., Булаев А.Г., Муравьев М.И., Журавлева А.Е., Григорьева Н.В., Меламуд В.С., Мощанецкий П.В.

* **Автор для переписки:**

Кондратьева Тамара Федоровна,

доктор биол. наук,

зав. лабораторией ИНМИ РАН

117312 Москва, Проспект 60-летия Октября, 7, корп. 2

Тел.: +7 (499) 135-04-21

Факс: +7 (499) 135-65-30

E-mail: kondr@inmi.ru

В лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов Института микробиологии им. С. Н. Виноградского (ИНМИ) РАН проводятся поисковые исследования, направленные на разработку технологических основ биотехнологической переработки зольно-шлаковых отходов объектов тепло- и электрогенерации с целью получения ценных металлов и редкоземельных элементов. Предложена разработка кучной и чановой биотехнологий выщелачивания ценных металлов и редкоземельных элементов из зольно-шлаковых отходов на основе применения сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, окисляющих элементную серу с образованием серной кислоты.

Целью настоящего исследования является селекция сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов с высокой скоростью окисления элементной серы до серной кислоты для получения растворов с низким значением рН.

Материалы и методы

Объекты исследования. Работу проводили с культурами штаммов ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (АХМ) из музея чистых культур лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ РАН, принадлежащих к родам *Acidithiobacillus* (*A. ferrooxidans* TFV-1, TFN-d, TFBk, TFO, TFL-2; *A. thiooxidans* OL-8, M, C; *A. caldus* ОП-1), *Sulfobacillus* (*S. thermosulfidooxidans* НТ-1, НТ-3, НТ-4, НТ-5, Sb-F, Sb-S, Sb-K) и *Ferroplasma* (*F. acidiphilum* ОП-2).

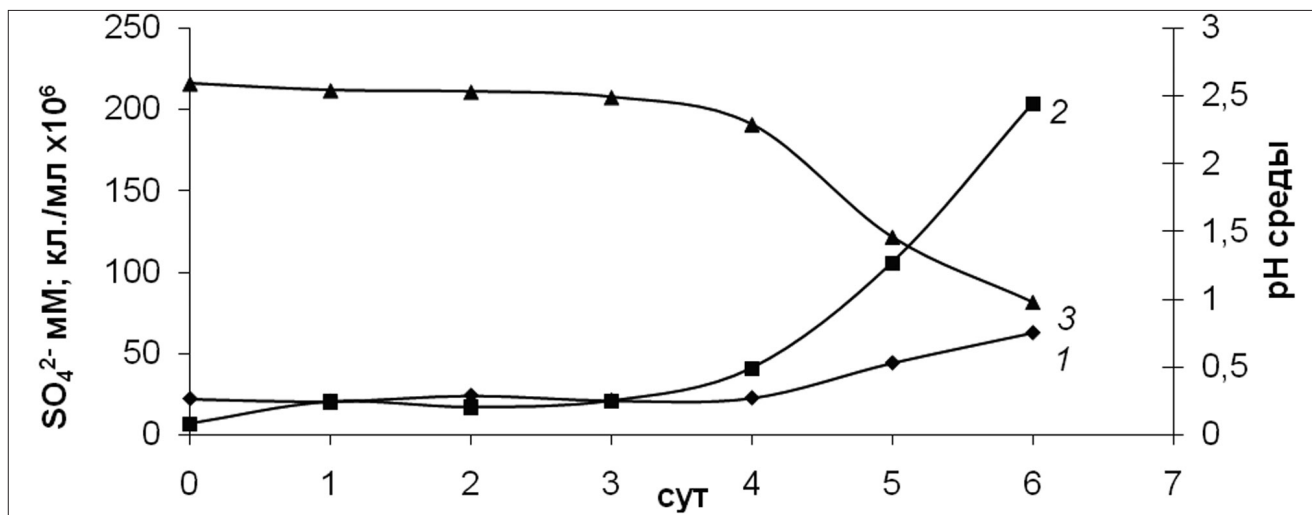
В составе сообщества аборигенных микроорганизмов, выделенных из пульпы реактора ЗИФ ЗАО «Полюс» при окислении флотоконцентрата сульфидной руды с высоким содержанием пирротина, были идентифицированы штаммы: *A. ferrooxidans* OL10-01, *Leptospirillum ferriphilum* OL10-02, *S. thermosulfidooxidans* OL10-03, *F. acidiphilum* OL-4, *Alicyclobacillus tolerans* OL10-05 [2]. В состав экспериментального сообщества микроорганизмов были включены, помимо вышперечисленных бактерий и архей из состава аборигенного сообщества микроорганизмов, следующие штаммы бактерий и архей: *S. olympiadicus* OL-6; *S. thermosulfidooxidans* OL-7; *S. thermosulfidooxidans* (штаммы Ser, P, M); *L. ferriphilum* (штаммы, выделенные из руд Кючусского и Олимпиадинского месторождений); *F. acidiphilum* — из флотоконцентрата руды Кючусского месторождения; штамм *A. thiooxidans* N (Армения); штамм *A. caldus* R; штамм *S. thermosulfidooxidans* НТ-3.

Окисление S-субстратов (S^0 , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$) отдельными штаммами и сообществами микроорганизмов. Опыты проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл среды [9] без добавления двухвалентного железа. В среду в качестве единственного источника энергии добавляли стерильные субстраты: элементную серу в количестве 10 г/л, или тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$) в количестве 3 г/л, или тетрагидрат калия ($K_2S_4O_6$) в количестве 3 г/л. Серу стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм, 3%-ные растворы тиосульфата натрия или тетрагидрата калия в минеральной среде стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Значение рН среды доводили 5М H_2SO_4 до 2,2–2,6. В качестве посевного материала использовали уравненные по числу клеток суспензии отдельных культур или сообществ микроорганизмов. Колбы помещали на качалку со 150 об./мин., выращивание проводили при 28 и 45 °С. Контрольные эксперименты проводили в колбах со стерильной средой и серными субстратами, не инокулируя их микроорганизмами.

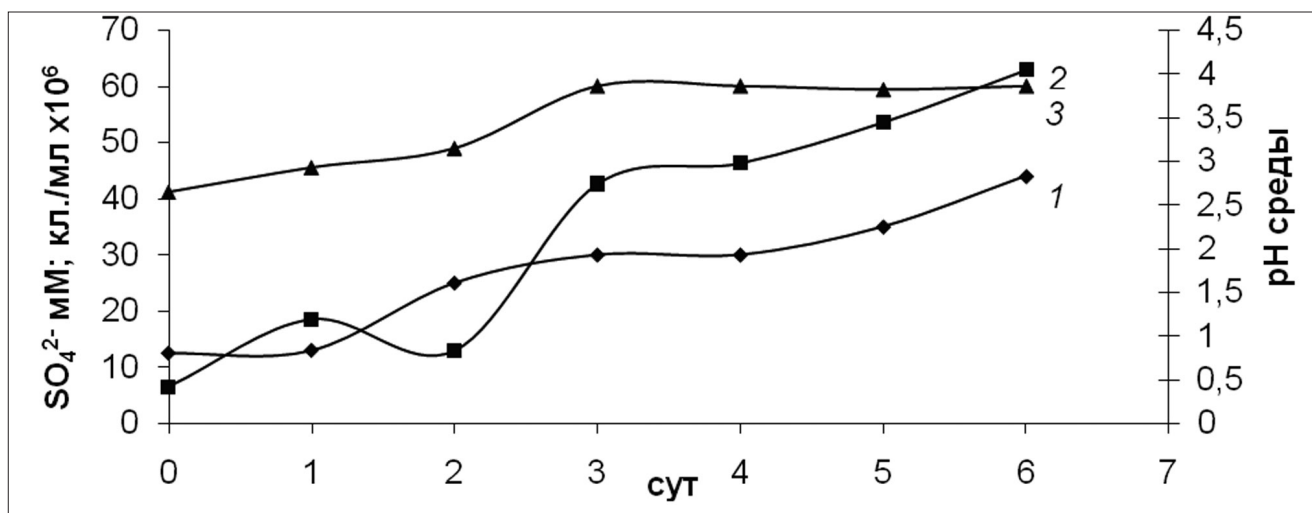
Методы анализа. Значения рН культуральной жидкости определяли на рН-метр-ионере Эксперт-001 («Эконикс-Эксперт», Россия), количество SO_4^{2-} — по методу [7], число клеток — методом прямого счета в световом микроскопе Amplival («Carl Zeiss», Германия) с фазово-контрастной приставкой.

Результаты и обсуждение

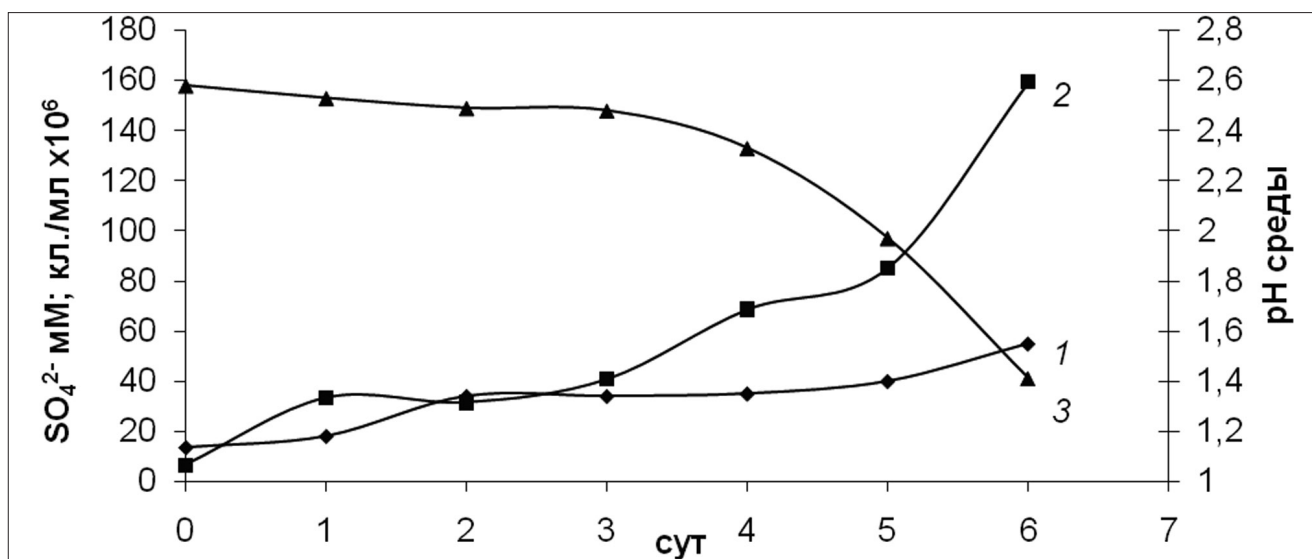
Окисление элементной серы аборигенным сообществом микроорганизмов. Пирротин, галенит, сфалерит, халькопирит и большинство других сульфидных минералов окисляются с образованием полисульфида и элементной серы в качестве основного промежуточного продукта [4–6, 10]. При инкубировании контрольных колб со стерильной средой и серой в течение 8 сут. не наблюдалось накопления в среде сульфатов, что свидетельствовало о том, что элементная сера практически не окислялась кислородом воздуха без участия микроорганизмов. При окислении элементной серы аборигенным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 мл в 1 сут. роста увеличивалось от $0,65 \times 10^7$ до $2,04 \times 10^7$, экспоненциальная фаза наступала только после 4 сут. и к 6 сут. число клеток достигало $20,35 \times 10^7$ (рис. 1а). Снижение значения рН коррелировало с ростом клеток и окислением серы. За период наблюдений значение рН снижалось от 2,59 до 0,98, в среде накапливалось 58,1 мМ SO_4^{2-} .



а



б



в

Рис. 1. Окисление аборигенным сообществом микроорганизмов элементарной серы (а), тиосульфата натрия (б), тетрагидрата калия (в). 1 – SO_4^{2-} (ммМ), 2 – число клеток (кл./мл × 10⁶), 3 – значение рН

Окисление тиосульфата аборигенным сообществом микроорганизмов. Тиосульфат является одним из основных продуктов, образующихся при окислении пирита [8]. Он нестабилен в кислой среде, при рН ниже 4,0 разлагается на сульфит и серу. При взаимодействии с серной кислотой из тиосульфата образуется сульфат и серноватистая кислота ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$), которая разлагается с образованием $\text{SO}_2 \uparrow$, S^0 и H_2O . В контрольном эксперименте без инокулята рН стерильной среды за 6 сут. повышался от 2,65 до 3,44–3,52. При окислении тиосульфата натрия аборигенным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 мл в 1 сут. роста увеличивалось от $0,65 \times 10^7$ до $1,85 \times 10^7$ (рис. 16). При этом количество SO_4^{2-} в среде оставалось без изменений. Возможно, этот прирост биомассы был обязан гетеротрофной составляющей сообщества за счет использования органического вещества, внесенного с инокулятом. Затем с увеличением значения рН число клеток снижалось, а после 2 сут. опять начинало увеличиваться, однако достигало через 6 сут. только $6,29 \times 10^7$ /мл. Вторая фаза роста, возможно, была связана с изменениями в соотношении микроорганизмов в сообществе в пользу более устойчивых к повышению значения рН, которое через 6 сут. возросло от 2,65 до 3,86. В среде за это время концентрация SO_4^{2-} составляла 40,9 мМ.

Окисление тетрагидрата аборигенным сообществом микроорганизмов. Метаболизм тетрагидрата идет через гидролиз с образованием серы, тиосульфата и сульфата: $\text{S}_4\text{O}_6^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + \text{S}^0$.

При окислении тетрагидрата калия аборигенным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут. роста увеличивалось от $0,65 \times 10^7$ до $3,33 \times 10^7$ /мл, достигая через 6 сут. $15,91 \times 10^7$ /мл (рис. 1в). Значение рН при этом снижалось от 2,58 до 1,41. Особенно заметное снижение рН среды наблюдали после 4 сут. роста, когда шло интенсивное увеличение числа клеток. В среде за 6 сут. концентрация SO_4^{2-} составляла 51,2 мМ.

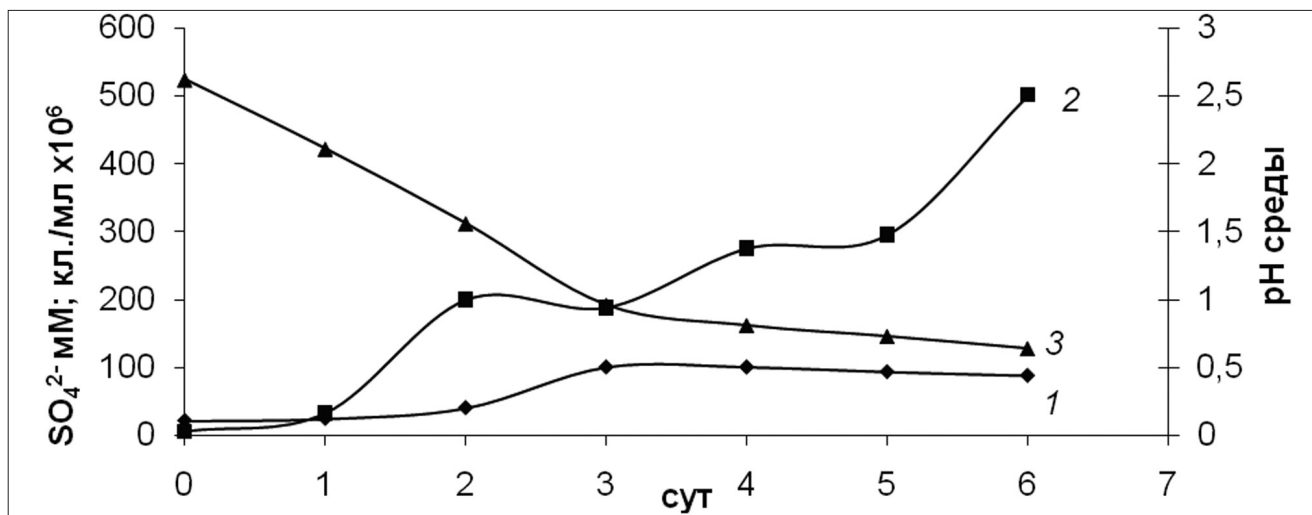
Как видно из рисунка 1в, в первые 4 сут. роста на среде с тетрагидратом было более высокое число клеток, чем на средах с элементарной серой и тиосульфатом в качестве источников энергии, и накапливалось больше SO_4^{2-} . Через 5 сут. роста аборигенное сообщество микроорганизмов на среде с элементарной серой перегоняло по числу клеток сообщество на среде с тетрагидратом. При этом наблюдалось более активное снижение рН до 1,46 и 1,97 и большее накопление SO_4^{2-} : 41,5 и 37,7 мМ, соответственно.

Окисление элементарной серы экспериментальным сообществом микроорганизмов. При окислении

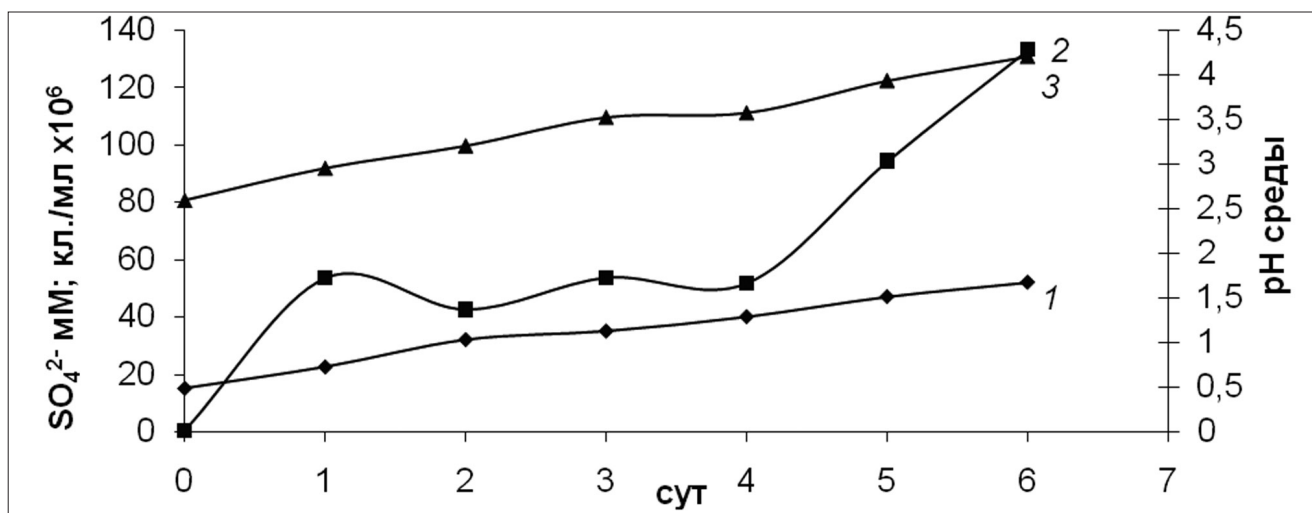
элементарной серы экспериментальным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут. роста увеличивалось от $0,65 \times 10^7$ /мл до $3,33 \times 10^7$ /мл (рис. 2а). Однако экспериментальному сообществу микроорганизмов, в отличие от аборигенного, не потребовалось длительной лаг-фазы для окисления элементарной серы. Первая фаза роста была отмечена после 1 сут. После 2 сут. наблюдали снижение скорости роста, возможно, из-за значения рН, неоптимального для микроорганизмов, доминирующих в сообществе в первые 2 сут. роста. В микробном сообществе в этот период происходило замещение доминирующих видов, устойчивых к низким значениям рН, который при этом снижался от 2,62 до 0,75. После 5 сут. наступала вторая активная фаза и число клеток достигало $51,62 \times 10^7$ /мл, но окисление элементарной серы до конечного продукта — сульфатного иона — не было отмечено. Максимальное количество SO_4^{2-} регистрировали на 3-е сут. эксперимента (96,1 мМ).

Окисление тиосульфата экспериментальным сообществом микроорганизмов. При окислении тиосульфата натрия экспериментальным сообществом микроорганизмов число клеток в первые сутки роста увеличивалось больше, чем на других S-субстратах, — от $0,65 \times 10^7$ /мл до $5,36 \times 10^7$ /мл (рис. 2б). В период от 1 до 4 сут. по мере повышения рН скорость роста снижалась. Однако после 4 сут. число клеток резко возрастало, и на 6-е сут. составляло $13,32 \times 10^7$ /мл. В экспериментальном сообществе микроорганизмов, более богатом по разнообразию включенных в его состав бактерий и архей, чем аборигенное сообщество, присутствуют штаммы, которые даже при увеличении рН после периода адаптации начинают активно размножаться за счет органических соединений, накопленных в среде в результате лизиса клеток ацидофильных микроорганизмов, не устойчивых к значению рН выше 3,0. При этом окисление тиосульфата продолжалось с низкой скоростью, тем не менее несколько превышающей скорость окисления $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ аборигенным сообществом. Концентрация SO_4^{2-} в среде достигала 48,4 мМ SO_4^{2-} через 6 сут. процесса.

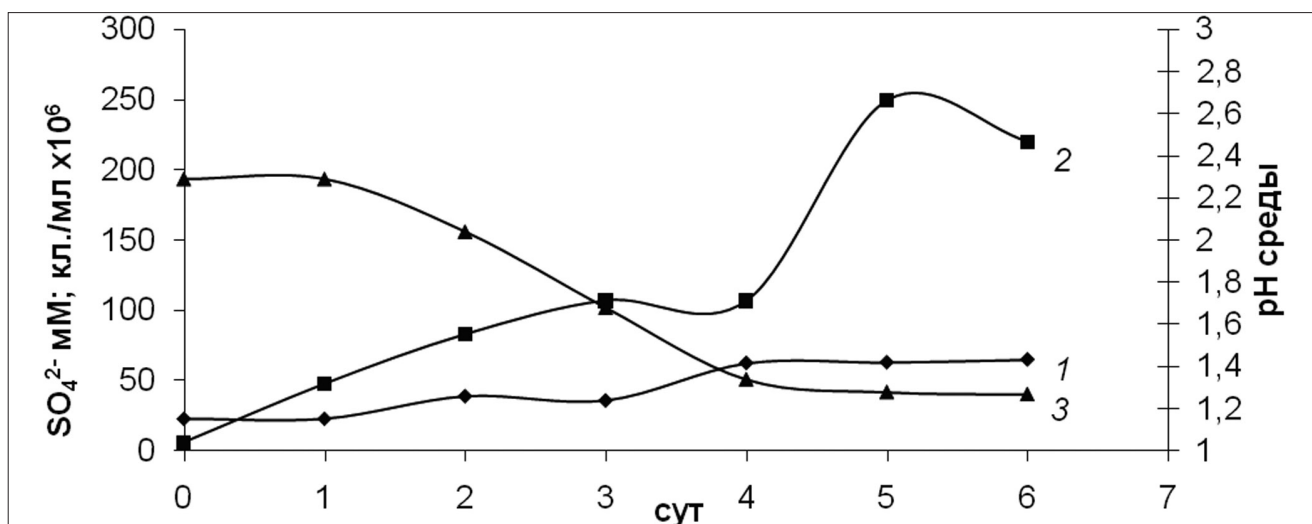
Окисление тетрагидрата экспериментальным сообществом микроорганизмов. При окислении тетрагидрата калия экспериментальным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут. роста увеличивалось от $0,65 \times 10^7$ /мл до $4,81 \times 10^7$ /мл, достигая через 5 сут. $24,98 \times 10^7$ /мл (рис. 2в). После 3 сут. прироста биомассы не было, значение рН при этом продолжало снижаться, содержание SO_4^{2-} возрастало, то есть в отсутствие прироста клеток процесс окисления продолжался. После 4 сут. наблюдалась вторая фаза роста, которая при



а



б



в

Рис. 2. Окисление экспериментальным сообществом микроорганизмов элементарной серы (а), тиосульфата натрия (б), тетрагидрата калия (в). 1 – SO_4^{2-} (мМ), 2 – число клеток (клет./мл × 10⁶), 3 – значение pH

низких значениях рН не была связана с окислением тетрагидрата, так как количество SO_4^{2-} в среде в это время оставалось на одном уровне. В экспериментальном сообществе микроорганизмов более широко представлены миксотрофные сульфобациллы, чем в аборигенном сообществе. Возможно, вторичный рост был вызван использованием в качестве энергетических субстратов органических веществ. В среде к концу эксперимента концентрация SO_4^{2-} практически не менялась после 4 сут. культивирования и составляла 60,5 мМ.

Скорость окисления S-субстратов экспериментальным сообществом микроорганизмов превышала скорость окисления аборигенным. По числу клеток в процессе окисления элементарной серы через 6 сут. роста экспериментальное микробное сообщество превосходило аборигенное: $51,62 \times 10^7$ /мл и $20,35 \times 10^7$ /мл, соответственно. Значение рН при этом достигало 0,75 и 0,98, соответственно.

В культуральной жидкости при окислении S-субстратов экспериментальным сообществом микроорганизмов через 6 сут. была отмечена более высокая концентрация SO_4^{2-} , чем при окислении аборигенным сообществом микроорганизмов.

Элементарная сера является лучшим энергетическим субстратом для получения раствора с низким значением рН по сравнению с тиосульфатом и тетрагидратом.

Была изучена скорость окисления элементарной серы и снижения рН культуральной жидкости разными АХМ и их селекционированными сообществами.

Окисление элементарной серы штаммами *A. ferrooxidans*. При переключении метаболизма штаммов *A. ferrooxidans* с окисления закисного железа на окисление элементарной серы максимальная скорость роста и окисления субстрата в первом пассаже были низкими (рис. 3а, 4а). Наиболее активным, согласно данным по скорости окисления элементарной серы (рис. 4а), оказался штамм ТФО, выделенный из пирротинового концентрата, при окислении которого в среде накапливается элементарная сера и серосодержащие продукты. При повторных пересевах скорость роста штаммов и активность окисления элементарной серы возрастали и достигали для каждого из штаммов индивидуальных максимальных значений в пятом пассаже (рис. 3б, 4б). У адаптированных штаммов резко возросла удельная скорость роста (табл. 1).

Наибольшая эффективность адаптации к элементарной сере была показана у штамма ТФО (рис. 3б, 4б). При этом за 6 сут. было отмечено снижение рН среды с 2,0 до 1,0.

Прирост числа клеток ($\times 10^8$) в 1 мл за сутки

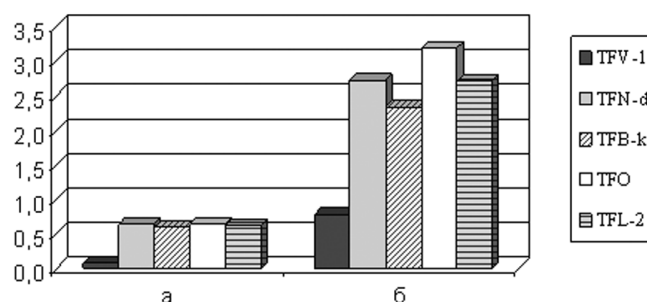


Рис. 3. Прирост числа клеток исходных (а) и адаптированных (б) штаммов *A. ferrooxidans* на среде с элементарной серой

$[SO_4^{2-}]$ г / (л сут)

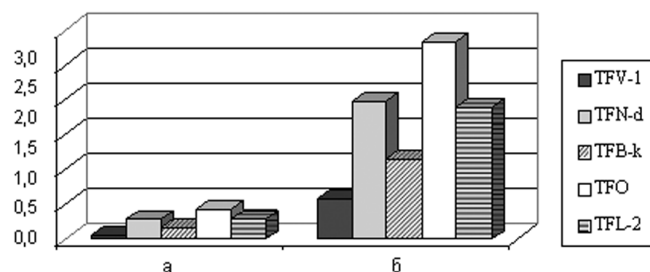


Рис. 4. Скорость окисления элементарной серы исходными (а) и адаптированными (б) штаммами *A. ferrooxidans*

Окисление элементарной серы штаммами *A. thiooxidans* и *A. caldus*. В соответствии с рисунком 5, наибольшая скорость окисления элементарной серы и снижения рН культуральной жидкости отмечена для штамма *A. caldus* ОП-1. За 6 сут. значение рН было снижено от 2,4 до 0,76. У двух штаммов *A. thiooxidans* ОI-8 и М уровень рН понижался за это же время до 0,88 и 0,98, соответственно.

Таблица 1

Максимальная скорость роста у исходных и адаптированных штаммов *A. ferrooxidans* на среде с элементарной серой

Штаммы	μ_{max} ч ⁻¹	
	исходный	адаптированный
ТФО	0,025	0,059
TFN-d	0,016	0,054
TFL-2	0,015	0,052
TFBk	0,012	0,046
TFV-1	0,010	0,030

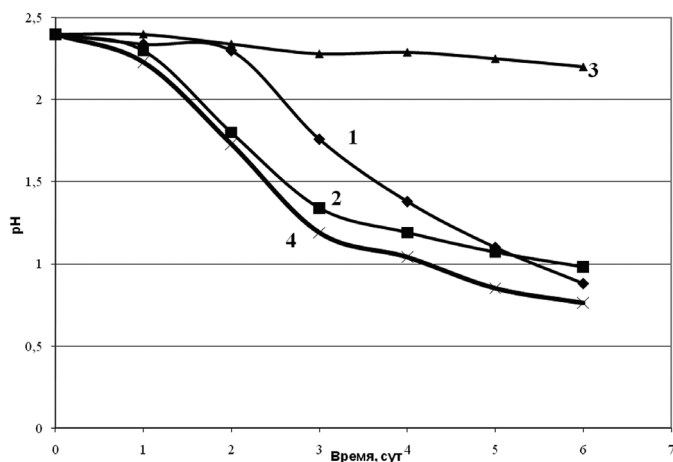


Рис. 5. Снижение pH культуральной жидкости при окислении элементарной серы штаммами рода *Acidithiobacillus*: 1 — *A. thiooxidans* Ol-8; 2 — *A. thiooxidans* M; 3 — *A. thiooxidans* C; 4 — *A. caldus* ОП-1

Окисление элементарной серы штаммами *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Все штаммы *S. thermosulfidooxidans*, изученные в данной работе, были способны к окислению элементарной серы в миксотрофных условиях ограниченное число пассажей, кроме НТ-3, который был выделен на среде, содержащей этот субстрат (табл. 2).

Таблица 2

Снижение pH культуральной жидкости при пассажах штаммов *S. thermosulfidooxidans* на среде с элементарной серой, $\text{pH}_{\text{нач.}}$ 2,5

Штамм	$\text{pH}_{\text{кон.}}$ культуральной жидкости			
	Пассажи			
	1	2	3	4
НТ-1	1,50	1,66	2,15	—
НТ-3	1,60	1,60	1,60	1,60
НТ-4	1,75	1,72	1,70	2,15
НТ-5	1,70	1,83	2,02	2,18

В таблице 3 приведены удельная скорость роста и скорость окисления элементарной серы и серосодержащих субстратов штаммами *S. thermosulfidooxidans*, выделенными из сообщества микроорганизмов, окисляющего сульфидную руду при 46–47 °С [1]. Штамм Sb-S рос с максимальной удельной скоростью роста 0,24 ч⁻¹ на среде с элементарной серой. Скорость окисления серы до конечного продукта — сульфатного иона — тоже была

значительной и составляла 0,75 г/(л·сут.). С более высокой скоростью роста, чем другие штаммы, штамм Sb-S рос на средах с тиосульфатом. На среде с тетрагидратом скорость роста у всех штаммов была почти одинаковой, с небольшим преимуществом у штамма Sb-S.

Таблица 3

Удельная скорость роста и скорость окисления элементарной серы и серосодержащих субстратов штаммами *S. thermosulfidooxidans*

Субстрат	Штамм Sb-S		Штамм Sb-K		Штамм Sb-F	
	μ_{max} ч ⁻¹	SO_4^{2-} , г/(л·сут.)	μ_{max} ч ⁻¹	SO_4^{2-} , г/(л·сут.)	μ_{max} ч ⁻¹	SO_4^{2-} , г/(л·сут.)
S ⁰	0,24	0,75	0,21	0,70	0,18	0,68
S ₂ O ₃ ²⁻	0,135	—	0,128	—	0,094	—
S ₄ O ₆ ²⁻	0,125	0,48	0,123	0,51	0,122	0,40

Адаптация селекционированного сообщества микроорганизмов к элементарной сере в двух температурных режимах. Для селекции сообщества АХМ с высокой скоростью окисления элементарной серы и снижения pH культуральной жидкости в двух температурных режимах (28 и 45 °С) в состав ранее созданного экспериментального сообщества были включены штаммы АХМ: *A. ferrooxidans* TFO, *A. thiooxidans* Ol-8, *A. caldus* ОП-1, *S. thermosulfidooxidans* НТ-3. Адаптацию дополненного штаммами АХМ экспериментального сообщества проводили в течение трех пассажей на среде с элементарной серой в качестве источника энергии в двух температурных режимах.

После трех пассажей сформированного сообщества микроорганизмов на среде с элементарной серой в двух температурных режимах значение pH культуральной жидкости за 6 сут. при 28 °С было снижено до 0,70, при 45 °С — до 0,90. Число клеток в 1 мл за 3 сут. при 28 °С увеличивалось с $0,65 \times 10^7$ до $1,88 \times 10^8$, за 6 сут. — до $7,26 \times 10^8$; за 3 сут. при 45 °С — с $0,86 \times 10^7$ до $1,42 \times 10^8$, за 6 сут. — до $6,20 \times 10^8$.

В соответствии с результатами таблицы 4, в третьем пассаже снижение значения pH культуральной жидкости за сутки было почти одинаковым при 28 °С и при 45 °С. Прирост числа клеток было большим при 28 °С, что, вероятно, обусловлено присутствием в микробном сообществе сульфобацилл, обладающих более низкой скоростью роста, чем ацидитиобациллы.

Таблица 4
Прирост числа клеток и снижение рН культуральной жидкости в третьем пассаже при окислении селекционированными сообществами микроорганизмов элементарной серы в двух температурных режимах

Температура, °С	Сутки	Снижение рН/сут.	Прирост числа клеток, ×10 ⁸ /сут.
28	0	0	0
	3	0,33	0,60
	6	0,25	1,20
45	0	0	0
	3	0,37	0,44
	6	0,23	1,02

Действительно, как следует из результатов микробиологического анализа сообществ микроорганизмов, при 45 °С в большем числе были представлены штаммы *A. caldus* и *S. thermosulfidooxidans*, чем в сообществе при 28 °С. В сообществе микроорганизмов при 28 °С в большем числе, чем в сообществе при 45 °С, были представлены штаммы *A. thiooxidans* и *A. ferrooxidans*.

Селекционированные сообщества АХМ будут использованы в дальнейшем в экспериментах по оптимизации условий выщелачивания ценных металлов и редкоземельных элементов из зольно-шлаковых материалов в аэрлифтных перколяторах (лабораторный аналог кучного/подземного выщелачивания) и в биореакторах (лабораторный аналог чанового/агитационного выщелачивания).

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Экспериментально созданное сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов обладает большей скоростью роста и окисления серосодержащих субстратов в качестве единственных источников энергии по сравнению с аборигенным сообществом микроорганизмов, выделенным из промышленного биореактора. Больше снижение рН наблюдалось на среде с элементарной серой по сравнению с тиосульфатом и тетрагидратом.
2. Большая скорость роста и окисления элементарной серы отмечена у штаммов: *A. ferrooxidans* TFO, *A. thiooxidans* ОI-8, *A. caldus* ОП-1, *S. thermosulfidooxidans* НТ-3 и Sb-S по сравнению с другими изученными штаммами АХМ.

3. На основе экспериментального сообщества микроорганизмов и ряда штаммов бактерий родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* созданы два сообщества АХМ, окисляющие элементарную серу при 28 и 45 °С.

4. В процессе адаптации сформированных сообществ микроорганизмов на среде с элементарной серой значение рН культуральной жидкости за 6 сут. при 28 °С было снижено до 0,7, при 45 °С — до 0,9.

Работа выполнена при поддержке ГК № 14.515.12.0002 Министерства образования и науки Российской Федерации.

Литература

1. Журавлева А.Е., Цаплина И.А., Кондратьева Т.Ф. Специфические особенности штаммов термоацидофильного микробного сообщества, окисляющих сурьмяную сульфидную руду // Микробиология. — 2011. — Т. 80. — № 1. — С. 74–85.
2. Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Мошанецкий П.В., Цаплина И.А., Григорьева Н.В., Журавлева А.Е. Селекция сообщества ацидохемолитотрофных микроорганизмов с высокой скоростью биоокисления флотоконцентрата пирротинсодержащей сульфидной руды // Прикл. биохимия и микробиология (в печати).
3. Кузьмин В.И., Пашков Г.Л., Карцева Н.В., Охлопков С.С., Кычкин В.Р., Сулейманов А.М. Способ извлечения редкоземельных металлов и иттрия из углей и золошлаковых отходов от их сжигания // Патент РФ № 2293134. Опубликовано 10.02.2007. Бюлл. 4.
4. Bhatti T.M., Bigam J.M., Carlson L., Tuovinen O.H. Mineral products of pyrrhotite oxidation by Thiobacillus ferrooxidans // Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — Vol. 59. — No. 6. — P. 1984–1990.
5. Fowler T.A., Crundwell F.K. Leaching of zinc sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: experiments with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64. — No. 10. — P. 3570–3575.
6. Fowler T.A., Crundwell F.K. Leaching of zinc sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: bacterial oxidation of the sulfur products increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — Vol. 65. — No. 12. — P. 5285–5292.
7. Kolmert A., Wikstroem P., Hallberg K.B. A fast and simple turbidimetric methods for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures // J. Microbiol. Methods. — 2000. — Vol. 41. — P. 179–184.
8. Schippers A., Jozsa P-G., Sand W. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — Vol. 62. — P. 3424–3431.

9. Silverman M.P., Lundgren D.C. Study on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yield // J. Bacteriol. – 1959. – Vol. 77. – No. 5. – P. 642–647.
10. Watling H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review // Hydrometallurgy. – 2006. – Vol. 84. – No. 1–2. – P. 81–108.

SELECTION OF COMMUNITIES OF ACIDOCHEMOLITHOTROPHIC MICROORGANISMS WITH HIGH OXIDATION RATE OF ELEMENTAL SULFUR

T.F. KONDRATIEVA, T.A. PIVOVAROVA, I.A. TSAPLINA, A.G. BULAEV, M.I. MURAVIEV, A.E. ZHURAVLEVA, N.V. GRIGORIEVA, V.S. MELAMUD, P.V. MOSCHANETSKY

Vinogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow

Elemental sulfur is the best energy substrate, compared with thiosulfate and tetrathionate, to reduce the pH of the culture fluid of the aboriginal communities and experimentally created acidophilic chemolithotrophic microorganisms. As a result of the oxidation of elemental sulfur at 28 °C experimentally created community of microorganisms decreased the pH of the culture fluid to a lower value (0.75) than aboriginal one, isolated from industrial bioreactor oxidation of sulphide ore flotation concentrate (0.98). Strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFO, *A. thiooxidans* Ol-8, *A. caldus* OP-1 and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* HT-3 in the oxidation of elemental sulfur showed a higher rate of decline in pH of the culture fluid in comparison with other studied strains of *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus*. As a result of adaptation of microbial communities that are created on the base of the pilot community and the above strains, the pH of the oxidation of elemental sulfur for 6 days was reduced to 0.7 and 0.9, respectively, at 28 and 45 °C.

Keywords: elemental sulfur, thiosulfate, tetrathionate, acidophilic chemolithotrophic microorganisms, microbial communities, pH, growth rate, oxidation rate of elemental sulfur.

ПЕЧЕНЬ АТЛАНТИЧЕСКИХ МАКРУРУСОВ – СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПИЩЕВОГО РЫБНОГО ЖИРА

Н.П. БОЕВА*, Е.В. СЕРГИЕНКО, О.В. БРЕДИХИНА, Ю.А. БАСКАКОВА

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», Москва

Разработаны научно обоснованные рекомендации по использованию печени атлантического макруруса для производства пищевого рыбного жира. Установлено, что максимальный выход жира достигается при осуществлении процесса вытапливания из измельченной печени при температуре вытапливания 60 °С с использованием для обогрева печени глухого пара. Рассмотрено влияние технологических параметров вытапливания жира, выделенного из печени атлантического макруруса, на показатели состава и качества липидов. Установлено, что способ вытапливания жира не оказывает существенного влияния на содержание витаминов, жирнокислотный состав, продукты гидролитической порчи, но значительно влияет на накопление продуктов окислительной порчи.

Ключевые слова: печень измельченная и целая, атлантический макрурус, пищевой и медицинский рыбный жир, технологии приготовления.

Введение

Исследования последних десятилетий в России и экономически развитых странах мира показали существенные изменения в структуре питания современного человека. Научно-техническая революция XX столетия привела к значительному снижению энергозатрат организма, в среднем до 2000–2300 ккал/сутки за счет широкого внедрения разнообразной техники, автоматизации и компьютеризации производства. В результате с уменьшением количества пищи, изменением ее структуры и качества изменилась и реальная обеспеченность человека эссенциальными (незаменимыми) пищевыми веществами и микронутриентами. Недостаточное потребление или отсутствие тех или иных незаменимых биологически активных веществ в организме вызывает нарушение биохимических реакций и функциональных процессов и приводит к возникновению различных заболеваний [8].

Анализ фактического питания и оценка пищевого статуса населения различных регионов Российской Фе-

дерации свидетельствует о том, что в рационе наблюдается избыточное потребление животных жиров и легко усвояемых углеводов. В то же время у большинства потребителей в дефиците эссенциальные полиненасыщенные жирные кислоты (омега-3 и омега-6), растворимые и нерастворимые пищевые волокна, витамины (группы В, F и др.), широкий спектр витаминopodobных веществ природного происхождения (L-карнитин, убихинон, холин, липоевая кислота и др.), макроэлементы (кальций, фосфор, калий и др.), микроэлементы (йод, железо, селен, цинк и др.) [3, 11]. Многочисленными исследованиями установлено, что в современных условиях человек уже не может адекватно обеспечить потребность организма в необходимых для жизнедеятельности питательных и минорных биологически активных веществах за счет традиционного питания.

Улучшение здоровья населения страны — одно из приоритетных направлений деятельности российского государства. Одной из основных задач государственной политики в области здорового питания является развитие производства пищевых продуктов, обогащенных незаменимыми компонентами, специализированных продуктов детского питания, продуктов функционального назначения и др. [9].

По данным Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, а также Департамента развития медицинской помощи и курортного дела, ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения», в период 2008–2009 гг. наблюдался

© 2013 г. Боева Н.П., Сергиенко Е.В., Бредихина О.В., Баскакова Ю.А.

* Автор для переписки:

Боева Нэля Петровна

д.т.н., главн. научн. сотрудник лаборатории БАВ и кормовых продуктов ФГУП «ВНИРО»

107140 Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел.: +7 (499) 264-90-76

E-mail: bav@vniro.ru

рост заболеваний сердечно-сосудистой системы, органов пищеварения, эндокринной системы и т.д. [2].

Одним из способов улучшения здоровья населения страны является обеспечение населения полноценным и сбалансированным питанием, разработка и внедрение в производство новых функциональных пищевых и диетических продуктов, в том числе из массовых видов водных биоресурсов, имеющих низкие ценовые параметры, таких как атлантические макрурусы *Coryphaenoides rupestris*, *Macrourus berglas*.

В настоящее время основную долю товарно-пищевой продукции, вырабатываемой из макрурусов, представляет продукция с малой степенью обработки, в основном это мороженая рыба, реже мороженое филе. Соответственно при разделке макрурусов образуются отходы в виде голов и внутренностей, включая ценную печень, которые перемалываются и выбрасываются за борт.

В связи с этим для решения проблемы повышения рационального использования сырья и рентабельности перерабатывающих предприятий считаем целесообразным предусмотреть переработку печени макрурусов с целью получения пищевого рыбного жира.

Как известно, биологическая ценность рыбных жиров определяется наличием в них биологически активных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [5, 10] и, в первую очередь, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот [5], а также эссенциальных жирных кислот: линолевой, линоленовой и арахидоновой, определяемых как витамин F. Кроме того, рыбные жиры из печени рыб характеризуются высоким содержанием жирорастворимых витаминов А и Д, способствующих укреплению иммунитета детей и людей пожилого возраста.

Дефицит трескового пищевого и медицинского жира вызвал необходимость изыскания новых видов сырья для его получения. В качестве такого сырья мы предлагаем использовать печень атлантических макрурусов и, в частности, *Coryphaenoides rupestris*.

Печень макруруса является наиболее ценной частью тела как по массе, так и по ее составу [1, 4, 7]. В таблице 1 [7] представлен химический состав печени макруруса, из данных которой видно, что 88% от сухого вещества всей печени приходится на липиды. Такое большое содержание липидов обосновывает целесообразность выделения жира из печени макруруса для последующего его использования в качестве пищевого и медицинского. В то же время печень макруруса может быть использована для приготовления консервов.

Таблица 1

**Химический состав печени макруруса
Coryphaenoides rupestris [7]**

Название	Содержание, %			
	вода	белок	липиды	минеральные в-ва
Печень макруруса <i>Coryphaenoides rupestris</i>	36,1	6,7	55,5	0,3

Некоторыми исследователями отмечено, что жирность печени рыбы, выловленной в мае, составляет 63–69%, в июне-августе – 67–80%, сентябре-январе – 63–69%. Существенных различий в зависимости от районов лова не наблюдается [6].

В липидах печени макруруса определено 27 компонентов жирных кислот, основными из которых по их количественному содержанию являются: миристиновая (14:0), пальмитиновая (16:0), пальмитолеиновая (16:1), стеариновая (18:0), олеиновая (18:1), октадекатетраеновая (18:4), эйкозеновая (20:1), эйкозапентаеновая (20:5), докозагексаеновая (22:6). Среди этих кислот преобладают: пальмитиновая (около 13–15%), пальмитолеиновая (около 7–8%), олеиновая (около 22–25%), эйкозапентаеновая (около 10–12%) и докозагексаеновая (около 11–13%). Сумма насыщенных кислот составляет около 20–24%, мононенасыщенных – около 38–40%, полиненасыщенных – также около 38–40%.

Содержание витамина А в жире печени зависит от сезонов, районов лова, вида макруруса и составляет 140–1960 МЕ/г. Наибольшее содержание витамина А (400–1090 МЕ/г) зафиксировано в печени макруруса, выловленного в мае-августе у берегов Исландии. В жире печени макруруса (*Coryphaenoides rupestris*), выловленного в летний период в Северо-Западной Атлантике, содержание витамина А достигает 1050 МЕ/г; в зимний период не превышает 150 МЕ/г [6].

Учитывая литературные данные о химическом составе, содержании витамина А и жирнокислотном составе жира из печени макрурусов, можно считать, что печень макрурусов является высококачественным сырьем для получения пищевого или медицинского жира.

Общеизвестно, что в последние годы возросла потребность в пищевом жире с высокой биологической ценностью, полученном с использованием щадящих температурных режимов. Наши исследования были направлены на разработку технологии получения пищевого жира, отличающейся от традиционной промышленной технологии получения рыбного жира способом и щадящи-

ми температурными режимами вытапливания и степенью измельчения сырья.

В настоящее время получение пищевого и медицинского рыбного жира из печени рыб в промышленности осуществляется из целой печени прогреванием сырья до 70 °С и вытапливанием при 100 °С с использованием обогрева острым паром с последующим его охлаждением и фильтрацией при определенных температурных режимах в целях удаления твердых триглицеридов и придания продукту товарного вида.

Нами предлагается использовать щадящий способ вытапливания жира из печени макруруса с применением для обогрева глухого пара, позволяющий увеличить выход жира и существенно снизить температуру вытапливания, содержание первичных и вторичных продуктов окисления в нем. Таким образом, предлагаемый метод будет способствовать повышению качества получаемого жира, в том числе на протяжении необходимых сроков хранения.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали замороженную в судовых условиях до -18 °С печень макруруса (*Coryphaenoides rupestris*).

В целях установления рациональных условий и режимов вытапливания жира из печени макруруса атлантического изучали влияние способа термообработки печени, степени ее измельчения и температуры вытапливания на выход жира, содержание витаминов А и Д, его качественное состояние и жирнокислотный состав.

Для этого вытапливание жира проводили из замороженной на воздухе до температуры около 0 °С (-2–0 °С) целой или измельченной до размера кусочков 3–5 мм печени при различных температурных режимах (50, 60, 70 °С) с использованием обогрева острым или глухим паром, а также (для сравнения) в условиях, предусмотренных действующей технологической инструкцией, — прогреванием до 70 °С и вытапливанием при 100 °С с обогревом острым паром.

Результаты и обсуждение

В результате вытапливания жира из целой мороженой печени макруруса с использованием для обогрева острого пара в диапазоне температур 50–70 °С выход жира составлял около 44% массы печени и около 66–70% массы находящегося в ней жира.

В то же время при вытапливании жира в принятых в промышленности условиях было выделено около 43% жира по отношению к массе печени и около 62% массы содержащихся в ней липидов.

Повышение температуры вытапливания с 50 до 60 °С приводит к значительному повышению выхода жира — с 44 до 60% массы печени и с 65 до 79% массы жира. Дальнейшее повышение температуры вытапливания (до 70 °С) сопровождается снижением выхода жира до 53% массы печени и почти до 62% массы жира, что объясняется образованием белково-липидных комплексов при высоких температурах с последующей трудностью выделения липидов из них.

Выявленная закономерность соблюдается и при вытапливании жира из измельченной печени.

В процессе вытапливания жира из целой печени с использованием для обогрева глухого пара установлены те же зависимости: минимальное количество жира было получено при используемом в промышленности температурном режиме. Повышение температуры вытапливания с 50 до 60 °С позволило повысить выход жира почти на 16% массы печени и на 18% массы ее липидов, а дальнейшее повышение температуры вытапливания до 70 °С вызывало уменьшение выхода жира на 10–13% исходной массы липидов печени и ее собственной массы соответственно против выхода жира в результате его вытапливания при 60 °С.

Обобщение полученных экспериментальных данных дает возможность выявить влияние способа вытапливания и степени измельчения печени на его выход (табл. 2).

Таблица 2

Выход жира из печени макруруса атлантического в зависимости от способа его вытапливания и степени измельчения

Способ выделения жира	Выход, % от	
	массы печени	массы липидов
Вытапливание острым паром из целой печени	42,8–60,2	62,4–79,4
Вытапливание острым паром из измельченной печени	44,5–64,5	64,9–83,6
Вытапливание глухим паром из целой печени	43,3–61,1	65,6–85,4
Вытапливание глухим паром из измельченной печени	45,2–66,4	66,2–88,5

Эти данные показывают, что выход жира в результате его вытапливания из печени колеблется в больших пределах (около 43–66% ее массы и около 63–88% ее липидов) и определяется степенью измельчения печени, способом и температурным режимом вытапливания жира. Измельчение печени приводит к повышению выхода жира на 1,5–4,0%, а использование обогрева глухим паром увеличивает выход жира дополнительно на 5–6%.

Измельчение печени и ее обогрев в процессе вытапливания жира глухим паром вместо острого в сумме повышают выход жира до 8–10%.

Вместе с тем отмеченные большие колебания в выходе жира в зависимости от условий его выделения обусловлены температурным режимом вытапливания, о чем свидетельствуют обобщенные данные, приведенные в таблице 3.

Таблица 3

Выход жира из печени макруруса атлантического при его вытапливании глухим паром с использованием различных температур

Условия выделения жира	Выход, % от	
	массы печени	массы липидов
Вытапливание из целой печени		
50 °С	44,6	66,8
60 °С	61,1	85,4
70 °С	56,6	75,3
70–100 °С	43,3	65,6
Вытапливание из измельченной печени		
50 °С	46,2	67,2
60 °С	66,4	88,6
70 °С	61,1	79,3
70–100 °С	45,2	66,2

Максимальный выход жира (более 80%) из печени атлантического макруруса достигается в случае осуществления процесса вытапливания из измельченной печени при температуре 60 °С с использованием для обогрева глухого пара. Использование рациональной температуры, глухого пара и измельченной печени позволяет повысить выход жира практически на 20% по сравнению с условиями, принятыми в промышленности.

Обоснованные рациональные условия вытапливания жира из печени макруруса атлантического обеспечивают максимальный выход жира.

Исследовано влияние измельчения печени и способа ее обогрева в процессе вытапливания жира

(использования острого или глухого пара) на качество получаемого жира. Полученные при этом данные, приведенные в таблице 4, показывают, что использование для вытапливания жира острого или глухого пара, как и измельчение печени, не оказывает влияния на его гидролитическое расщепление, но отражается на степени окисления жира.

Таблица 4

Степень гидролиза и окисления жира печени макруруса атлантического в зависимости от способа вытапливания

Способ вытапливания жира	Кислотное число жира, мг КОН/г	Перекисное число жира, % йода	Альдегидное число жира, мг коричневого альдегида в 100 г
Вытапливание острым паром из целой печени	12,7	0,31	23,7
Вытапливание острым паром из измельченной печени	12,8	0,39	24,6
Вытапливание глухим паром из целой печени	12,4	0,24	22,1
Вытапливание глухим паром из измельченной печени	12,2	0,30	23,1

При вытапливании с использованием для обогрева печени глухого пара в выделенном жире по сравнению с полученным в результате применения для обогрева печени острого пара оказывается меньше первичных продуктов окисления — перекисных соединений. В случае вытапливания жира из целой печени при обогреве острым паром его перекисное число соответствует 0,31% йода, глухим паром — 0,24% йода. В то же время способ вытапливания жира в небольшой степени отражается на количестве вторичных продуктов окисления — альдегидов, реагирующих с бензидином и выражаемых значением альдегидного числа в пересчете на коричневый альдегид (см. табл. 4).

Изучено влияние измельчения печени и способа ее обогрева на содержание витаминов в выделенном жире. Полученные при этом данные показывают, что в жире, выделенном из целой печени при ее обогреве острым паром, обнаружено 390 МЕ (в 1 г) витамина А и 70 МЕ витамина Д. При вытапливании жира из измельченной печени в этих же условиях в 1 г выделенного жира зафиксировано 396 МЕ витамина А и 62 МЕ витамина Д.

В жире, полученном с использованием глухого пара и неизмельченной печени, находилось 72 МЕ/г витамина Д, а из измельченной – 68 МЕ/г; уровень витамина А составлял 392–393 МЕ/г.

Таким образом, из приведенных данных следует, что способ вытапливания (применение острого или глухого пара) и степень измельчения печени не оказывают влияния на содержание витаминов в полученном жире.

Таблица 5

Состав основных жирных кислот жира, вытопленного из печени макруруса атлантического разной степени измельчения острым и глухим паром при 60 °С, %

Кислота (код)	Печень, вытопленная острым паром		Печень, вытопленная глухим паром	
	неизмельченная	измельченная	неизмельченная	измельченная
14:0	3,53	4,32	4,52	4,52
16:0	15,04	13,85	14,81	14,59
16:1	7,39	7,95	8,34	7,81
18:0	2,52	2,52	2,66	2,35
18:1	25,44	23,50	24,88	22,54
18:2	1,51	1,67	1,65	0,85
18:3	1,35	1,34	1,38	1,14
18:4	3,42	5,16	5,17	4,39
20:1	3,73	4,29	2,05	4,60
20:2	0,11	0,11	0,08	0,26
20:4	1,58	2,61	1,17	0,95
20:5	12,70	11,40	10,59	11,20
22:1	1,60	2,65	2,35	3,89
22:5 ω 6	1,10	1,42	2,21	3,10
22:5 ω 3	3,12	2,41	3,01	1,43
22:6 ω 3	12,99	12,41	11,22	13,18
Насыщенные	21,99	21,41	23,15	22,30
Мононенасыщенные	39,05	38,99	38,76	39,57
Полиненасыщенные	38,96	39,60	38,09	38,13

Примечание: полужирным шрифтом обозначены эйкозапентаеновая (20:5) и докозагексаеновая (22:6) кислоты

Для изучения биологической ценности липидов печени макруруса атлантического, полученных различным способом, методом газожидкостной хроматографии с использованием пламенно-ионизационного детектора, полярной фазы и набивной колонки идентифицировано 27 жирных кислот, основными из которых по их количественному соотношению являются: миристиновая (14:0), пальмитиновая (16:0), пальмитолеиновая (16:1), стеариновая (18:0), олеиновая (18:1), октадекатетраеновая (18:4), эйкозеновая (20:1), эйкозапентаеновая (20:5), докозагексаеновая (22:6) (табл. 5). Среди этих кислот преобладают: пальмитиновая (около 13–15%), пальмитолеиновая (около 7–8%), олеиновая (около 22–25%), эйкозапентаеновая (около 10–12%) и докозагексаеновая (около 11–13%). Сумма насыщенных кислот составляет около 20–24%, мононенасыщенных – около 38–40%, полиненасыщенных – также около 38–40%.

Анализ полученных данных показал, что способ вытапливания жира (использование глухого или острого пара) практически не оказывает влияния на соотношение отдельных жирных кислот, а также сумму насыщенных, моно- и полиненасыщенных кислот (см. табл. 5).

Различия в соотношениях жирных кислот как доминирующих, так и присутствующих в малых и даже весьма малых количествах, находятся в пределах точности определения использованного метода газожидкостной хроматографии. В итоге жир, вытопленный из целой печени, по сумме насыщенных, моно- и полиненасыщенных кислот почти идентичен жиру, полученному при аналогичном температурном режиме из измельченной печени.

Заключение

Из приведенных исследований влияния способа и условий выделения жира (степени измельчения сырья, способа обогрева, температурного режима вытапливания) из печени макруруса атлантического на выход жира, а также на степень его гидролиза и окисления, содержания витаминов (А и Д) и жирнокислотный состав можно сделать следующие выводы:

- подтверждено установленное ранее существенное влияние способа и условий выделения жира на его выход и степень окисления и несовершенство применяемых в промышленности способа и условий вытапливания жира из печени макруруса (использование неизмельченной печени, острого пара и высокой температуры);

- установлено, что применительно к печени макруруса атлантического измельчение печени и ее обогрев в процессе вытапливания глухим паром вместо острого повышают выход жира до 8–10%. Выявлено существенное влияние температурного режима вытапливания на выход жира. Максимальный выход жира (более 88% заключенного в печени) достигается при осуществлении процесса вытапливания из измельченной печени, температуре вытапливания 60 °С с использованием для обогрева печени глухого пара;
- способ и условия выделения жира при отсутствии влияния на степень гидролитического расщепления существенно отражаются на степени его окисления. При этом основное воздействие оказывают способ обогрева печени и температурный режим вытапливания жира;
- вытапливание жира с помощью глухого пара вместо применяемого острого пара и снижение температуры процесса способствуют существенному снижению содержания первичных и вторичных продуктов окисления, что очень важно для стойкости к окислению выделенного жира при последующем хранении.

Таким образом, на основании проведенных исследований разработана перспективная технология получения рыбного жира пищевого или медицинского назначения из печени атлантических макрурусов.

Новая технология предусматривает вытапливание жира из измельченной печени глухим паром при температуре 60–65 °С в течение 20–40 мин. при непрерывном перемешивании, обеспечивает увеличение выхода жира на 20–25% по сравнению с выходом жира в промышленных условиях. Разработаны научно обоснованные рекомендации по использованию печени макруруса для производства пищевого жира и техническая документация ТУ 9281-121-00472124-2012 «Жир пищевой из печени макруруса атлантического» и ТИ.

Полученный по новой технологии жир характеризуется улучшенным качеством, что выражается в снижении содержания первичных продуктов окисления (перекисей) и вторичных продуктов окисления (альдегидов).

Пищевой рыбный жир, полученный по этой технологии, может использоваться как самостоятельный пищевой продукт, а также как компонент для обогащения пищевых продуктов, в том числе функционального назначения, и сырье для получения биологически активных добавок к пище, что позволит получать продукты с высокой долей добавленной стоимости.

Литература

1. Двинин Ю.Ф. Массовый и химический состав тупорылого макруруса Северной Атлантики / Технология рыбных продуктов: Сб. науч. тр. ПИНРО. – Мурманск: ПИНРО, 1981. – С. 3–15.
2. Заболеваемость населения России в 2009 году: статистические материалы / Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Департамент развития медицинской помощи и курортного дела. ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Росздрова. Часть I. – 2010. – 120 с.
3. Ипатова Л.Г., Кочеткова А.А., Нечаев А.П., Тутельян В.А. Жировые продукты для здорового питания. Современный взгляд. – М.: ДеЛи принт, 2009. – 396 с.
4. Константинова Л.Л. Технохимическая характеристика некоторых резервных для промысла рыб Северной Атлантики и перспективы их использования / Материалы VII Международной научно-практической конференции «Производство рыбной продукции: проблемы, новые технологии, качество». – 2009. – С. 198–201.
5. Левачев М.М. Жиры рыб в диетотерапии гиперлипотеидемий и гипертонии. – М.: ВНИИМИ, 1988. – 84 с.
6. Любавина Л.А., Байдалова Г.Ф., Хоботилова Л.Д. Химический состав и свойства жира печени макруруса / Технология рыбных продуктов: Труды ПИНРО. – Мурманск, 1977. – Вып. 39. – С. 130–138.
7. Миндер Л.П. Весовой и химический состав макруруса (*Macrurus berglax*) / Технология рыбных продуктов: Труды ПИНРО. – Мурманск, 1967. – Вып. 22. – С. 127–132.
8. Окара А.И. Новая генерация пищевых продуктов в условиях инновационной деятельности: тенденции развития и проблемы продвижения на рынок // Вестник ХГАЭП. – 2012. – № 1 (58). – С. 88–96.
9. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25 октября 2010 г. N 1873-р «Об основах государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года». Вступило в силу 11 ноября 2010 г. // Российская газета, 3 ноября 2010. – Федеральный выпуск № 5328. – 19 полоса.
10. Ржавская Ф.М. Жиры рыб и морских млекопитающих. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 470 с.
11. Тутельян В.А., Разумов А.Н., Вялков А.И. и др. Научные основы здорового питания / Под ред. Тутельяна В.А. – М.: Издательский дом «Панорама», 2010. – 815 с.

LIVER ATLANTIC GRENADIER – RAW MATERIAL FOR THE PRODUCTION OF FOOD FISH OIL

N.P. BOEVA, E.V. SERGIENKO, O.V. BREDIHINA, Y.A. BASKAKOVA

All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

Developed evidence-based guidelines on the use of liver Atlantic grenadier for the production of food fish oil. Found that the maximum oil yield is achieved when carrying out the process of rendering crushed liver at 60 °C with heating for liver deaf steam. The influence of process parameters rendering the oil extracted from the liver of Atlantic grenadier, the performance and quality of lipids were considered. Found that the way to rendering the oil has no significant influence on the content of vitamins, fatty acid composition, hydrolytic products of damage, but significant effect on the accumulation of products of oxidative damage.

Keywords: crushed liver and whole, Atlantic grenadier (*Macrourus*), food and medical fish oil, preparation technology.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ И ХЕМОТАКСОНОМИЯ ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВ CARYOPHYLLACEAE JUSS. И ASTERACEAE DUMORT.

В.В. ВОЛОДИН^{1*}, Д.М. ШАДРИН¹, Я.И. ПЫЛИНА¹, Ю.И. ДРУЗЬ¹,
С.О. ВОЛОДИНА¹, И.Ф. ЧАДИН¹, Л. ДАЙНАН²

¹ ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия;

² Уэймутский колледж, Уэймут, Великобритания

Изучено распределение фитоэкдистероидов, структурных аналогов гормонов линьки насекомых, в растениях семейств *Caryophyllaceae* и *Asteraceae*, являющихся характеристическими во флоре Европейского Северо-Востока России. С использованием метода молекулярной систематики установлено, что на внутрисемейственном уровне виды-продуценты образуют клады, включающие в себя филогенетически близкие роды *Silene*, *Lychnis* и *Petrocoptis* в семействах *Caryophyllaceae* и *Rhaponticum*, *Serratula*, *Acroptilon*, *Amberboa* и некоторых представителей *Centaurea* в семействе *Asteraceae*.

Ключевые слова: экдистероиды, вторичные метаболиты, молекулярно-филогенетический подход, *Caryophyllaceae*, *Asteraceae*.

Введение

Известно, что вторичные метаболиты растений играют важную роль в качестве защитных факторов или сигнальных молекул во взаимоотношениях растений с другими организмами. Их наличие/отсутствие отражает адаптационную стратегию видов в процессе эволюции (Харборн Д., 1985 [3]; Wink M., 2003 [17]). Это находит свое отражение в распределении определенных классов вторичных метаболитов в филогенетической системе растений таким образом, что близкие виды, как правило, содержат преимущественно близкие группы веществ (принцип филогенетического родства растений). Однако такой принцип не носит абсолютный характер и проявляется как тенденция (Высочина Г.И., 1989) [1]. Основные причины этого заключаются в несовершенстве традиционных систем классификации растений, основанных на морфолого-анатомических признаках, недостаточной чувствительности применяемых методов анализа, и при этом может наблюдаться утрата

биохимического признака у некоторых видов в ходе их эволюции. Поэтому в настоящее время для установления взаимоотношений между распределением вторичных метаболитов и филогенетической классификацией растений успешно применяются методы систематики, основанные на сравнении последовательностей ДНК.

Цель данной работы состоит в установлении связей между распространением фитоэкдистероидов, структурных аналогов гормонов линьки насекомых, и филогенетической классификацией растений в семействах *Caryophyllaceae* Juss. и *Asteraceae* Dumort. с применением методов молекулярной систематики.

Материалы и методы

Для молекулярно-филогенетического анализа были взяты образцы растений, принадлежащие 19 видам семейства *Caryophyllaceae*, относящиеся к 14 родам (*Silene*, *Lychnis*, *Heliosperma*, *Gastrolychnis*, *Melandrium*, *Steris*, *Gypsophila*, *Spergula*, *Sagina*, *Honckenya*, *Schleranthus*, *Stellaria*, *Cerastium*, *Moehringia*), и 16 видам семейства *Asteraceae*, относящиеся к 5 родам (*Serratula*, *Centaurea*, *Saussurea*, *Acroptilon* и *Cirsium*), которые были собраны в ходе экспедиций на территории Европейского Северо-Востока России, а также образцы, предоставленные гербарием Института биологии Коми НЦ УрО РАН (SYKO). Для сравнительного анализа в нашем исследовании использованы нуклеотидные последовательности

© 2013 г. Володин В.В., Шадрин Д.М., Пылина Я.И., Друзь Ю.И., Володина С.О., Чадин И.Ф., Дайнан Л.

* Автор для переписки:

Володин Владимир Витальевич

доктор биологических наук, профессор

зав. лабораторией Института биологии Коми НЦ УрО РАН,

167982 Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

E-mail: volodin@ib.komisc.ru

из базы данных Национального центра биотехнологической информации США Genbank — номера последовательностей указаны в приложении.

Тотальная ДНК была выделена из высушенных измельченных образцов растений с помощью набора для выделения ДНК из растительного материала «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Hilden, Germany) согласно инструкциям производителя, а также СТАВ-методом с небольшими модификациями (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987) [8]. Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C . Амплификацию фрагмента проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей 5,0 мкл $10\times$ буфера с Mg^{2+} , 0,5 мкл каждого праймера (15 μM), 5,0 мкл $1\times$ раствора dNTP, 0,5 мкл Taq-полимеразы (5,0 единиц), 36,5 мкл деионизированной воды и 2,0 мкл геномной ДНК (5–20 нг). Для амплификации фрагмента ITS1-5,8S-ITS2 в качестве прямого праймера использовали ITS1-Р 5'-aaccttatcatttagaggaagg-3' (Ridgway K.P. et al., 2003) [12] или ITS5 5'-tcgtaacaagggtcccgttagtg-3', в качестве обратного праймера ITS-4 5'-tcctccgcttattgatgc-3' (White T.J. et al., 1990) [16]. Амплификацию проводили в термоциклере MiniOpticon (Bio-Rad Laboratories, USA) по следующей схеме: предварительная денатурация — 4 мин. при 95°C ; 30 циклов: денатурация — 40 с при 94°C ; отжиг праймера — 1 мин. при 57°C ; элонгация — 1,30 мин. при 72°C ; финальная элонгация — 7 мин. при 72°C . Продукты реакции амплификации разделяли методом электрофореза в 1,3%-ном агарозном геле в $1\times$ ТА буфере, окрашивали бромистым этидием; для визуализации использовали трансиллюминатор UVT-1 («Биоком», Москва). В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали 100 bp Ladder DNA marker (100–3000 bp) (Ахуген, США). Для очистки полученного продукта использовали наборы АхуРер DNA Gel Extraction Kit (Ахуген, США) и QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Количество выделенной ДНК и ПЦР-продукта определяли на спектрофотометре Pico200 (United Kingdom). Секвенирование проводилось с применением набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator v. 1.1 на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer на базе Института биологии Коми НЦ УрО РАН (Applied Biosystems, США).

Обработка и анализ последовательностей проводились с помощью пакета программ MEGA версия 5 (Tamura K. et al., 2011) [14]. Выравнивание последовательностей проводилось с помощью программы ClustalW, входящей в данный пакет программ, и корректировалось вручную. Для построения филогенетических деревьев был использован метод объединения ближайших соседей

(Neighbor-Joining — NJ). В качестве модели замен использовалась модель Кимура-2 с попарным удалением гэпов. В качестве оценки статистической достоверности устойчивости дерева использовался бутстреп-индекс (1000 репликаций), причем достоверно установленными узлами считались те, для которых значение данного коэффициента превышало 70.

Результаты и обсуждение

Считалось, что не существует связи между распространением экдистероидов и филогенетической классификацией растений, поскольку экдистероиды встречаются как в филогенетически близких, так и удаленных семействах. Внутри семейств и даже внутри родов могут встречаться виды как содержащие, так и не содержащие экдистероиды. Однако недавно было показано, что биохимический признак наличия экдистероидов на внутрисемейственном уровне закреплен в трибах, хотя эта закономерность и не носит абсолютного характера. Сказанное относится к концентрациям экдистероидов в растениях, обнаруживаемых с помощью биотеста на культуре клеток *Drosophila melanogaster* (то есть гормонально активным концентрациям по отношению к насекомым [5, 15]. При этом оказалось, что следовые количества экдистероидов, не активные в биотесте, но обнаруживаемые с помощью радиоиммунного анализа (РИА) в концентрации менее 4 мкг/г, содержат едва ли не все виды растений. Это свидетельствует о том, что гены, кодирующие ферменты биосинтеза экдистероидов, присутствуют у всех растений, но их выраженная экспрессия происходит только в группах близкородственных видов, ограниченных определенными родами и трибами, в которых, по-видимому, экдистероиды выполняют экологическую функцию [6, 15].

Ранее с использованием молекулярно-филогенетических данных была сделана попытка изучить распространение фитоэкдистероидов на примере трибы *Sileneae* (семейство *Caryophyllaceae*) (Zibareva L. et al., 2003) [18]. На полученном нами филогенетическом дереве (рис. 1), построенном методом объединения соседей NJ, с высокой поддержкой коэффициента бутстрепа выделяется ряд клад, соответствующих семи трибам по представлениям D.T. Harbaugh et al. (2010) [10] и A.K. Greenberg & M. J. Donoghue (2011) [9]. Наиболее широко представлены трибы *Sileneae* (клада I) — 47 видов и *Caryophylleae* (клада II) — 12 видов. Трибы *Sperguleae* (клада III), *Sagineae* (клада IV), *Scleranthaeae* (клада V), *Alsineae* (клада VI) и *Arenarieae* (клада VII) представлены немногочисленно.

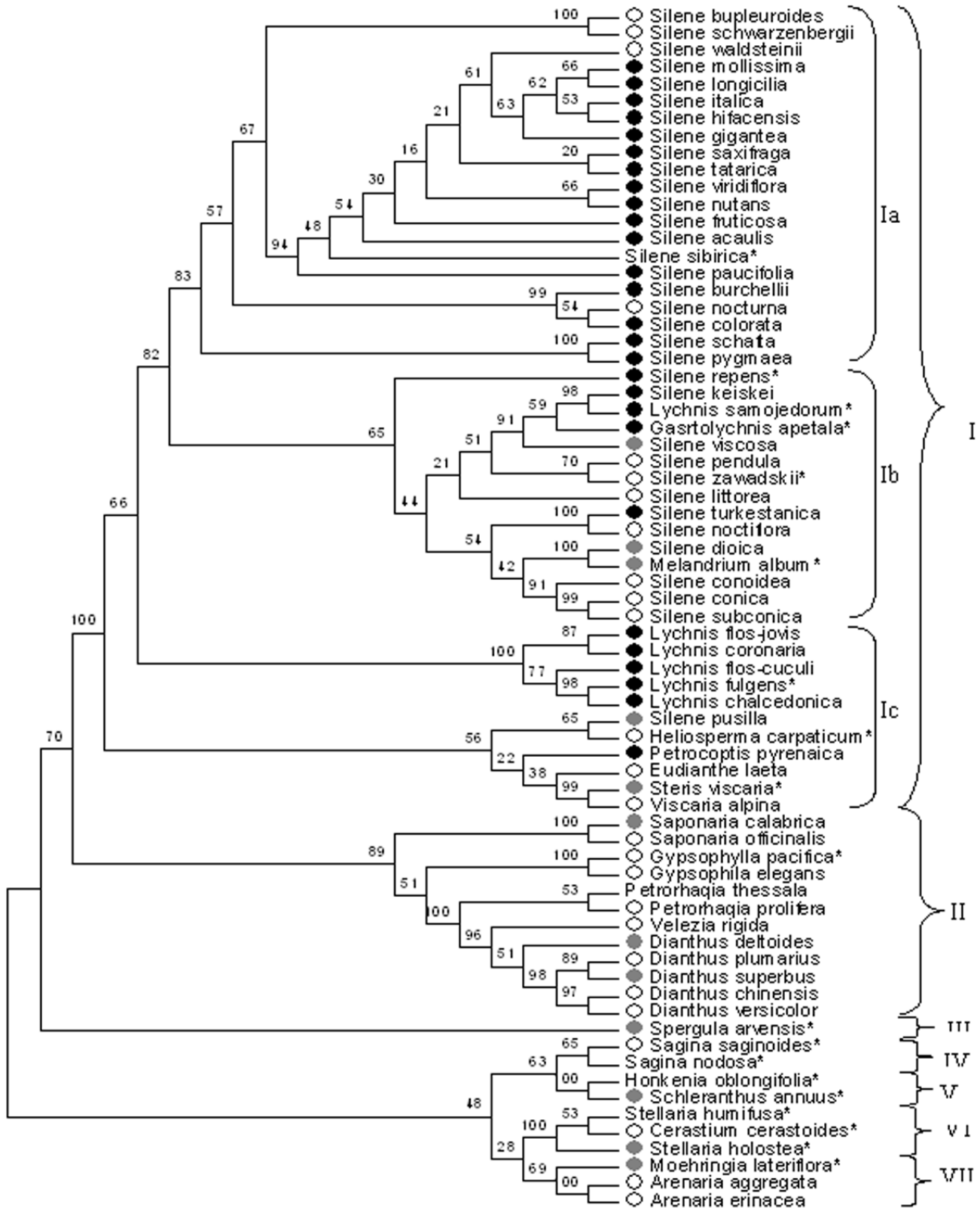


Рис. 1. Филогенетическое древо семейства *Caryophyllaceae* Juss., построенное методом объединения соседей (NJ) на основе анализа фрагмента ITS1-5.8S-ITS2.

○ — виды, где экидистероиды не обнаружены; ● — виды со следовым количеством экидистероидов, обнаруживаемым только с помощью РИА (менее 4 мкг/г), ● — виды с умеренной и высокой концентрацией экидистероидов, обнаруживаемой с помощью биотеста (более 4 мкг/г), * виды, последовательности которых получены в ходе исследования

В трибе *Sileneae* разделение по родам полностью соответствует ее генетической классификации, предложенной В. Oxelman et al. (2001) [11]. Из выделяемых им 8 родов в нашей работе представлено 6 родов. Род *Silene* разделяется на две субклады Ia и Ib. Субклада Ia представлена экдистероид-положительными видами, хотя в ней выделяется группа видов, не содержащих экдистероиды. В субкладе Ib преобладают виды с отсутствием или с низкой концентрацией экдистероидов, но в ней также выделяется группа с высоким их содержанием.

Нами показано, что в роду *Silene* виды-продуценты фитоекдистероидов, имеющие положительный ответ в биотесте на культуре клеток *Drosophila melanogaster*, группируются отдельно от видов, не содержащих экдистероиды, и видов со следовыми количествами экдистероидов, не активными в биотесте, но обнаруживаемыми с помощью радиоиммунного анализа в концентрации менее 4 мкг/г.

Анализ других родов трибы *Sileneae* (субклада Ic) подтвердил, что экдистероидсодержащими родами можно считать роды *Lychnis* и *Petrocoptis*, тогда как представители других родов не синтезируют фитоекдистероиды. В других трибах семейства *Caryophyllaceae*, представленных в данной работе (клады II–VII), не встречаются виды-продуценты экдистероидов, хотя во многих из них присутствуют виды с концентрацией экдистероидов в следовых количествах. Поэтому необходимо дальнейшее изучение с привлечением большего числа образцов.

В семействе *Asteraceae*, насчитывающем, по разным источникам, 20–25 тыс. видов, экдистероиды обнаружены только у представителей трибы *Cardueae*. Эта триба включает в себя две подтрибы: *Carduinae*, виды которой содержат экдистероиды в следовых количествах, и *Centaureinae*, которая включает в себя виды с экологически значимой концентрацией, то есть «положительные» в биотесте на культуре клеток *Drosophila melanogaster* (Volodin V. et al., 2002) [15].

На основании полученных молекулярных данных было построено филогенетическое древо трибы *Cardueae* подсемейства *Lactucoideae* с использованием метода объединения соседей (рис. 2). На филогенетическом древе исследованные таксоны трибы *Cardueae* распределены в двух кладах (I и II): кллада II объединила с высокой поддержкой (коэффициент бутстрепа составил 100%) виды родов *Saussurea*, *Cirsium*, *Carduus*, *Alfredia* и *Arctium*; кллада I сформирована представителями родов *Serratula*, *Rhaponticum*, *Acroptilon*, *Centaurea*, *Amberboa* и *Carthamus*. Полученное древо согласуется с известной

системой А.Л. Тахтаджяна (1987) [2], согласно которой кллада II объединяет роды подтрибы *Carduinae*, а кллада I — роды подтрибы *Centaureinae*.

Следует подчеркнуть, что виды, давшие отрицательную реакцию в биотесте, представлены двумя родами *Carthamus* и *Centaurea*, образующими подкладу Ib. На молекулярно-филогенетическом древе подкладу Ia образовывали виды, давшие положительную реакцию в биотесте и представленные пятью родами: *Rhaponticum*, *Acroptilon*, *Amberboa*, *Serratula*, *Centaurea*. Причем, в роду *Centaurea* из 14 исследованных видов значительное содержание экдистероидов было обнаружено только у *C. americana* и *C. moschata* (Sarker S., 1997) [13]. Важно отметить, что последний из приведенных видов, согласно «Флоре СССР», относится к роду *Amberboa* (Черепанов С.К., 1995) [4], филогенетически близкому роду *Acroptilon* и *Rhaponticum*. Исходя из данного замечания, уже не кажется неожиданным обнаружение высокого содержания экдистероидов как в образцах растений *Acroptilon repens*, так и в *Amberboa moschata* (= *C. moschata*).

Полученные данные соответствуют представлению М. Dittich (1977) [7] о разделении подтрибы *Centaureinae* на основании палинологических, морфологических и анатомических признаков на группы родов, согласно которому род *Acroptilon* входит в одну группу с экдистероидсодержащими родами *Rhaponticum* и *Serratula*, а роды *Carthamus* и *Centaurea* относятся к другой группировке родов, представители которых не содержат значимых концентраций экдистероидов. На построенном молекулярно-филогенетическом древе представители родов *Acroptilon*, *Rhaponticum* и *Amberboa* имеют общего, предположительно, экдистероидсодержащего предка.

В семействе *Asteraceae* среди представителей трибы *Cardueae* виды с высоким содержанием экдистероидов образуют клладу, включающую в себя филогенетически близкие роды *Rhaponticum*, *Serratula*, *Acroptilon* и *Amberboa*. Среди представителей рода *Centaurea* могут быть обнаружены виды с высоким содержанием экдистероидов, филогенетически близкие к родовому комплексу *C. americana*.

Заключение

Таким образом, применение хемотаксономического и молекулярно-филогенетического подходов позволило выявить связи между распространением экдистероидов в растениях и их филогенетической классификацией. Результаты исследования показали, что на внутрисемейственном уровне виды-продуценты образуют клады,

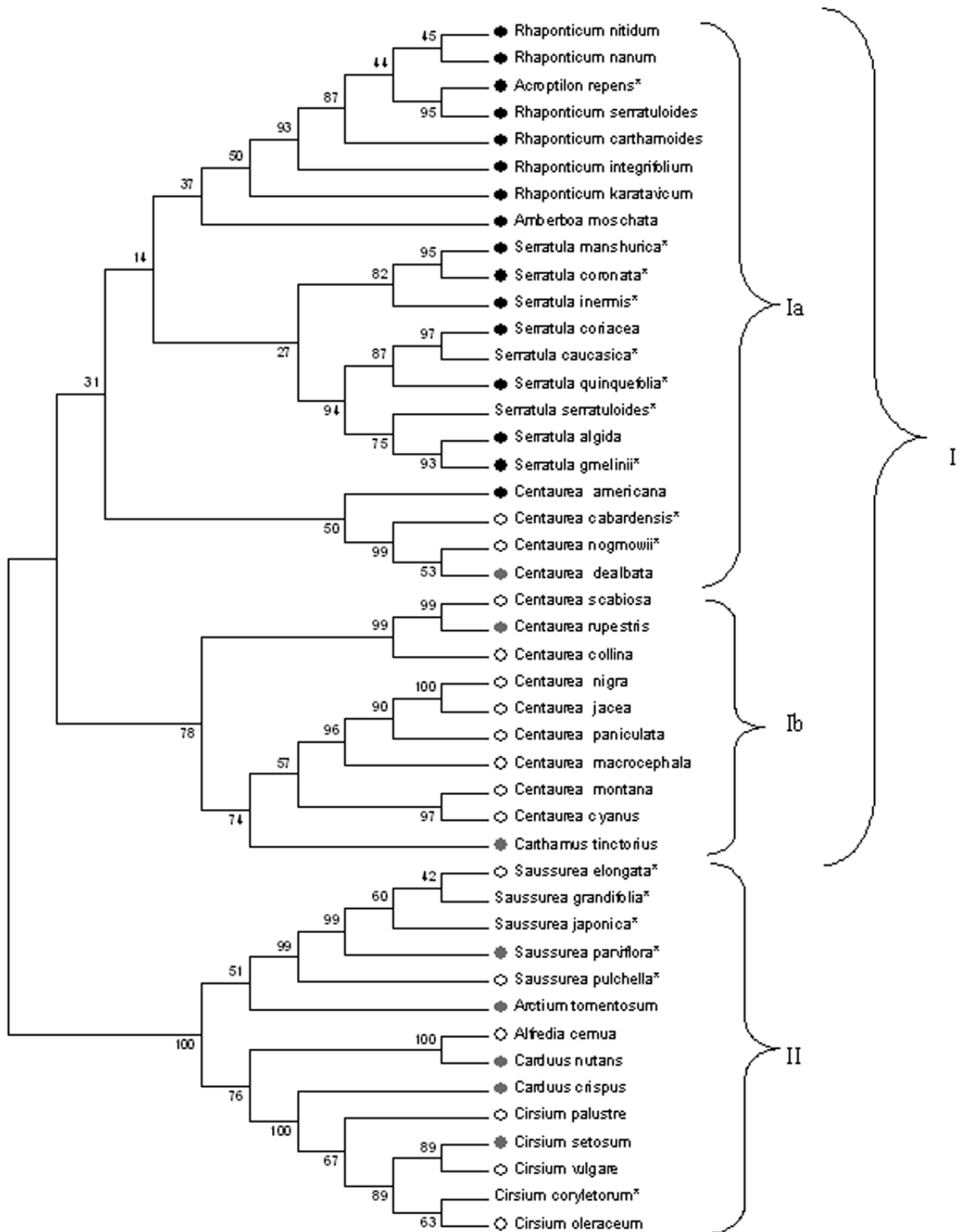


Рис. 2. Филогенетическое древо трибы *Cardueae* семейства *Asteraceae Dumort.*, построенное методом объединения соседей (NJ) на основе анализа последовательностей ITS1 и ITS2.

○ — виды, где экистероиды не обнаружены; ● — виды со следовым количеством экистероидов, обнаруживаемым только с помощью РИА (менее 4 мкг/г); ● — виды с умеренной и высокой концентрацией экистероидов, обнаруживаемой с помощью биотеста (более 4 мкг/г), * виды, последовательности которых получены в ходе исследования

включающие в себя филогенетически близкие роды *Silene*, *Lychnis* и *Petrocoptis* в семействах *Caryophyllaceae* и *Rhaponticum*, *Serratula*, *Acroptilon*, *Amberboa* и некоторых представителей *Centaurea* в семействе *Asteraceae*.

Данный подход может быть использован для разработки научно обоснованного прогноза поиска ресурсных видов растений-продуцентов вторичных метаболитов.

К статье дается приложение с информационной справкой.

Приложение: номера последовательностей из Genbank

Amberboa moschata (L.) DC., L35883.1; *Acroptilon repens* (L.) DC., JX274518; *Arctium tomentosum* Mill., GQ281035.1; *Alfredia cernua* (L.) Cass., AY826225.1; *Carduus crispus* L., EF010530.1; *Carduus nutans* L., A Y780401.1; *Carthamus tinctorius* L., HM921410.1; *Centaurea cyanus* L., AY826254.1; *Centaurea montana* L., HQ407430.1; *Centaurea scabiosa* L., FJ459692.1; *Centaurea rupestris* L., FJ459689.1; *Centaurea collina* L., FJ459654.1; *Centaurea macrocephala* Mussin-Puschk. ex Willd., DQ319131.1; *Centaurea nigra* L., DQ319138.1; *Centaurea paniculata* L., AM114319.1; *Centaurea jacea* L., DQ319125.1; *Centaurea dealbata* Willd., L35886.1; *Centaurea americana* Nutt., L35885.1; *Centaurea cabardensis* (G. Koss ex Tschuchrukidze) Czer., JX274509; *Centaurea nogmovii* (G. Koss ex Tschuchrukidze) Czer., JX274510; *Cirsium palustre* (L.) Scop., AY826265.1; *Cirsium oleraceum* (L.) Scop., AY780402.1; *Cirsium vulgare* (Savi) Ten., AF443716.1; *Cirsium setosum* (Willd.) Bess., JX274508; *Cirsium coryletorum* Kom., JX274507; *Klasea coriacea* (Fisch. & C.A. Mey.) Holub, DQ310926.1; *Serratula algida* Iljin, DQ310929.1; *Rhaponticum nitidum* Fisch., DQ310937.1; *Rhaponticum karatavicum* Regel & Schmalh., DQ310940.1; *Rhaponticum integrifolium* C. Winkl., DQ310934.1; *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin, DQ310933.1; *Rhaponticum serratuloides* (Georgi) Bobr., DQ310941.1; *Rhaponticum nanum* Lipsky, DQ310939.1; *Saussurea parviflora* (Poir.) DC., JX274503; *Saussurea pulchella* (Fisch.) Fisch., JX274505; *Saussurea elongata* DC., JX072967; *Saussurea grandifolia* Maxim., JX274506; *Saussurea japonica* (Thunb.) DC., JX274504; *Serratula coronata* L., JX274515; *Serratula gmelinii* Tausch, JX274516; *Serratula caucasica* Boiss., JX274513; *Serratula quinquefolia* Bieb. ex Willd., JX274512; *Serratula serratuloides* (Fisch. & C.A. Mey.) Takht., JX274517; *Serratula*

inermis Gilib., JX274511; *Serratula manshurica* Kitag., JX274514.

Arenaria aggregata Loisel, AY691563.1; *Arenaria erinacea* Boiss., AY691596.1; *Cerastium cerastoides* (L.) Rchb., JX274523; *Dianthus deltoides* L., GU440810.1; *Eudianthe laeta* Rchb. ex Willk., X86882.1; *Gastrolychnis apetala* (L.) Tolm. et Kozhanczиков, JX274519; *Gypsophila elegans* Bieb., L78090.1; *Gypsophila pacifica* Kom., JX274528; *Heliosperma carpaticum* (Zapal.) Klok., JX274526; *Honckenya oblongifolia* Torr. & Gray, JX274537; *Lychnis chalcedonica* L., X86894.1; *Lychnis coronaria* (L.) Desr., X86891.1; *Lychnis flos-cuculi* L., X86893.1; *Lychnis flosjovis* (L.) Desv., X86892.1; *Lychnis samojedorum* (Sambuk) Perf., JX274522; *Lychnis fulgens* Fisch. ex Curt., JX274529; *Melandrium album* (Mill.) Garcke, JX274530; *Moehringia lateriflora* (L.) Fenzl, JX274536; *Petrocoptis pyrenaica*, FJ384018.1; *Petrorhagia prolifera* (L.) P.W. Ball & Heywood, GU440883.1; *Sagina nodosa* (L.) Fenzl, JX274524; *Sagina saginoides* (L.) Karst., JX274525; *Saponaria calabrica* Guss., X86898.1; *Saponaria officinalis* L., GU440887.1; *Scleranthus annuus* L., JX274538; *Silene acaulis* (L.) Jacq., FJ384019.1; *Silene bupleuroides* L., X86864.1; *Silene burchellii* Otth, X86868.1; *Silene colorata* Poir., X86842.1; *Silene conica* L., FN821100.1; *Silene conoidea* L., FN821101.1; *Silene dioica* (L.) Clairv., FN821112.1; *Silene fruticosa* L., DQ059405.1; *Silene gigantea* L., X86862.1; *Silene hifacensis* Rouy ex Willk., DQ059394.1; *Silene keiskei* Miq., AJ629909.1; *Silene littorea* Brot., X86825.1; *Silene longicilia* (Brot.) Otth., DQ059396.1; *Silene mollissima* (L.) Pers., DQ059399.1; *Silene noctiflora* L., FN821141.1; *Silene nocturna* L., X86841.1; *Silene nutans* L., DQ059410.1; *Silene paucifolia* Ledeb., FJ384023.1; *Silene pendula* L., FN821142.1; *Silene pussilla* Waldst. et Kit., EF118061.1; *Silene pygmaea* Adams, FN821143.1; *Silene repens* Patrin, JX274527; *Silene saxifraga* L., X86873.1; *Silene schafta* S.G. Gmel. ex Hohen., AJ831792.1; *Silene schwarzenbergii* Halacsy, FN821095.1; *Silene sibirica* (L.) Pers., JX274521; *Silene subconica* Friv., HQ334913.1; *Silene tatarica* (L.) Pers., X86871.1; *Silene turkestanica* Regel, FN821147.1; *Silene viridiflora* L., DQ059414.1; *Silene viscosa* (L.) Pers., FN821148.1; *Silene waldsteinii* Griseb., X86867.1; *Silene zawadskii* Fenzl., JX274535; *Spergula arvensis* L., JX274532; *Stellaria holostea* L., JX274531; *Stellaria humifusa* Rottb., JX274520; *Steris viscaria* (L.) Rafin., JX274533; *Velezia rigida* L., GU440888.1; *Viscaria alpina* (L.) G. Don fil., EF118111.1.

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта научных исследований УРО РАН «Ресурсный и биотехнологический потенциал растений Урала и сопредельной территории Европейского Северо-Востока России – продуцентов важнейших групп биологически активных веществ» (12-И-4-2072).

Литература

1. Высочина Г.И. Хемотаксономический метод в подборе объектов интродукции / Ускорение интродукции растений Сибири: Сб. науч. тр. – Новосибирск: Наука, 1989. – С. 56–60.
2. Тахтаджян А.Л. Система магнолиофитов. – Л.: Наука, 1987. – 438 с.
3. Харборн Д. Введение в экологическую биохимию. – М.: Мир, 1985. – 176 с.
4. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. – СПб.: Мир и семья, 1995. – 992 с.
5. Dinan L. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae // Eur. J. Entomol. – 1995. – Vol. 92. – P. 295–300.
6. Dinan L., Savchenko T., Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plants // Cell. Mol. Life Sci. – 2001. – Vol. 58. – P. 1121–1132.
7. Dittrich M. Cynareae-systematic review / In: The biology and chemistry of Compositae. V.H. Heywood, I.B. Harborne, B.L. Turner (Eds.). – London, 1977. – P. 999–1015.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
9. Greenberg A.K., Donoghue M.J. Molecular systematics and evolution in Caryophyllaceae // Taxon. – 2011. – Vol. 60 (6). – P. 1637–1652.
10. Harbaugh D.T., Nepokroeff M., Rabeler R.K., McNeill J., Zimmer E.A., Wagner W.L. A new lineage-based tribal classification of the family Caryophyllaceae // Int. J. Plant Sci. – 2010. – Vol. 171(2). – P. 185–198.
11. Oxelman B., Liden M., Rabeler R.K., Popp M. A Revised generic classification of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae) // Nordic Journal of Botany. – 2001. – Vol. 20. – P. 743–748.
12. Ridgway, K.P., J.M. Duck and J.P. Young. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron // BMC Ecology. – 2003. – Vol. 3:8. Doi:10.1186/1472-6785-3-8.
13. Sarker S., Savchenko T., Whiting P., Sik V., Lafont R. and Dinan L. Occurrence of Ecdysteroids in the Genus *Centaurea* (Compositae): 20-Hydroxyecdysone from *Centaurea moschata* // Biochemical Systematics and Ecology. – 1997. – Vol. 25. – P. 367–368.
14. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Molecular Biology and Evolution (submitted). – 2011.
15. Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids // Biochemical Systematics and Ecology. – 2002. – Vol. 30. – P. 525–578.
16. White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / In: Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J., White T.J. (Eds.). PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, – Academic Press, San Diego, 1990. – P. 315–322.
17. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 64. – P. 3–19.
18. Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R. and Dinan L. Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 64. – P. 499–517.

MOLECULAR PHYLOGENY AND CHEMOTAXONOMY OF ECDYSTEROID-CONTAINING PLANTS OF THE FAMILIES CARYOPHYLLACEAE JUSS. AND ASTERACEAE DUMORT.

V.V. VOLODIN¹, M.D. SHADRIN¹, Y.I. PYLINA¹, Y.I. DRUZ¹,
S.O. VOLODINA¹, I.F. CHADIN¹, L. DAYNAN²

¹ Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia;

² Weymouth College, Weymouth, United Kingdom

The distribution phytoecdysteroids, structural analogues of insect molting hormones in plants of the families *Caryophyllaceae* and *Asteraceae*, is a characteristic of the flora of the European North-East of Russia. Using molecular systematics found that at the intrafamilial level of species producers form clades that include phylogenetically close genera *Silene*, *Lyshnis* and *Petrocoptis* in families *Caryophyllaceae* and *Rhaponticum*, *Serratula*, *Acroptilon*, *Amberboa* and some representatives of *Centaurea* in the family *Asteraceae*.

Keywords: ecdysteroids, secondary metabolites, molecular phylogenetic approach, *Caryophyllaceae*, *Asteraceae*.

БАКТЕРИАЛЬНО-КЛЕТОЧНЫЙ РЕАГЕНТ НА ОСНОВЕ БЕЛКА А: ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

О.Ю. СОСНИНА, Е.А. КАЛАШНИКОВА, Д.В. ГРЯЗНОВА,
В.Н. СПЕРАНСКАЯ, А.М. НИКОЛАЕВА*

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Пермь

Разработана технология получения бактериально-клеточного реагента (БКР), содержащего белок А. Отработаны и оптимизированы стадии реакторного культивирования золотистого стафилококка штамма Cowan 1, ультрафильтрации и стабилизации бактериальной суспензии. Предложен экспрессный метод контроля белка А на стадиях технологического процесса получения БКР — реакция бактериосорбции иммунокомплексов. Показана возможность практического применения БКР как естественного иммобилизата белка А в реакции коагутинации для производства иммунобиологических препаратов, а также и для лабораторной диагностики.

Ключевые слова: бактериально-клеточный реагент, белок А, коагутинация.

Введение

В фундаментальных и прикладных исследованиях широкое применение нашло уникальное свойство белка А золотистого стафилококка неспецифически через Fc-фрагмент взаимодействовать с иммуноглобулинами класса G человека и некоторых животных. Впервые эта особенность белка А была установлена А. Forsgren and J. Sjoquist в 1966 году [11].

В настоящее время с использованием белка А разработаны методы определения и выделения иммуноглобулинов, очистки моноклональных антител. Реагенты, представляющие собой очищенный белок А, конъюгированный с различными маркерами (энзимными, флуоресцентными, радиоизотопными), позволяют проводить определение антигенов и антител в жидких средах, на твердой фазе, непосредственно в тканях и клетках. Комплексы белка А с частицами золота или серебра используются в цитохимических исследованиях для выявления целого ряда гормонов и ферментов [8, 15–17, 19, 21]. Многообразно применение этого белка в виде

естественного бактериально-клеточного иммобилизата — стафилококковой клетки, содержащей белок А. В частности, имеется много публикаций по применению такого бактериально-клеточного реагента (БКР) в реакции коагутинации (РКОА) для определения различных антигенов инфекционной и неинфекционной природы [1, 2, 4–7, 9, 10, 12, 20]. Выпускаются коммерческие наборы для определения стрептококков, сальмонелл, пневмококков, гемофильной палочки, менингококков и ряда возбудителей других инфекций.

Целью данных исследований явились отработка технологических этапов получения стабилизированного белка А-содержащего реагента и изучение возможности его применения в производстве иммунобиологических препаратов и в лабораторной диагностике.

Материалы и методы

Для приготовления стафилококкового реагента использовали штамм золотистого стафилококка Cowan 1. В экспериментах по культивированию оценивались плотные и жидкие питательные среды. В процессе приготовления стафилококкового реагента применяли ультрафильтрацию и центрифугирование.

Активность белка А определяли с помощью реакции радиальной иммунодиффузии (РИД), реакции бактериосорбции иммунных комплексов (РБИК) — оригинальный вариант РКОА. РИД ставили по общепринятой методике, используя стандартную сыворотку крови человека и моноспецифическую сыворотку против иммуноглобулина G человека (из набора диагностических сывороток для

© 2013 г. Соснина О.Ю., Калашникова Е.А., Грязнова Д.В., Сперанская В.Н., Николаева А.М.

* Автор для переписки:

Николаева Алевтина Максимовна

д.б.н., заместитель директора по науке и инновационному развитию филиала ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

614089 Пермь, ул. Братская, 177

Тел.: +7 (342) 262-32-75

E-mail: a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

РИД производства «ИмБио», г. Н.-Новгород). Экспериментальные специфические реагенты готовили на основе аффинноочищенных антител [3].

Результаты и обсуждение

Штамм Cowan 1 золотистого стафилококка считается наилучшим продуцентом поверхностного (клеточного) белка А [13]. Для получения БКР с активным белком А, как правило, стафилококк выращивают на средах сложного состава, содержащих ростовые факторы и различные добавки (солевые компоненты, тиамин, никотиновая кислота, дрожжевой аутолизат, гидролизат казеина). Однако использование таких многокомпонентных сред значительно усложняет приготовление реагентов для РКОА.

В связи с этим нами были проведены исследования по подбору простых и экономичных питательных сред и условий культивирования стафилококкового штамма Cowan 1, позволяющих получать высокоактивные по белку А суспензии. В предварительных экспериментах по культивированию в лабораторных условиях были использованы плотные питательные среды: мясопептонный агар, агар на переваре Хоттингера и пептонно-дрожжевая среда. По данным литературы, выращивание стафилококка при 40 °С является оптимальным для продукции белка А [18]. Однако в сравнительных экспериментах было показано, что культуры, выращенные при 40 °С, трудно смывались с поверхности среды и давали «зернистые», склонные к спонтанной агглютинации суспензии. Поэтому в дальнейшем культивирование вели при 37–38 °С. Для приготовления микробной взвеси культуру смывали с поверхности агара 0,01 М фосфатным буферным раствором, рН 7,2–7,4. Удаление остаточных компонентов питательной среды из полученной суспензии и ее концентрирование осуществляли с помощью центрифугирования. На этапах культивирования в качестве контрольного параметра использовали показатель оптической плотности микробной взвеси. Готовый препарат стандартизовали по массе влажного осадка, ресуспендируя его до получения 10% концентрации. Наибольший выход биомассы обеспечивала среда на переваре Хоттингера (5–7,5 г с 1 л питательной среды). В то же время активность белка А бактериально-клеточного реагента, определяемая по способности связывать сывороточный иммуноглобулин G и тестируемая с помощью реакции радиальной иммунодиффузии в геле, была практически равноценна при культивировании стафилококка на всех

указанных средах. Так, по данным этого метода, 1 мл 10% реагента связывал около 1,6 мг IgG человека.

Однако применение плотных питательных сред в условиях производства нетехнологично. Поэтому в дальнейших экспериментах при отработке реакторного культивирования нами была показана целесообразность использования для выращивания стафилококка жидкой казеиново-кислотной среды, которая обеспечивает высокий уровень накопления стафилококковых клеток, содержащих белок А: выход микробной массы с 1 л среды составил 13–16 г.

Следующим этапом в отработке технологии был процесс концентрирования с последующей стабилизацией полученной суспензии. На первой стадии концентрирования с целью очистки микробной взвеси от компонентов питательной среды использовали ультрафильтрацию на полых волокнах марки ВПУ-15. Этап ультрафильтрации и все последующие стадии технологического процесса контролировали с помощью экспрессной реакции РБИК. Диагностическим реагентом для этой реакции служит растворимый иммунный комплекс (ИК): антитоксин лошади + гомологичный анатоксин, в составе которого интактный к белку А антитоксин приобретает способность активно с ним взаимодействовать [14, 15]. РБИК удобна в выполнении, проводится по типу микроагглютинации на стекле.

В предварительных опытах нами было установлено, что длительный ультрафильтрационный процесс в режиме концентрации и диафильтрации с использованием полых волокон обеспечивает высокую степень очистки стафилококковой суспензии от низкомолекулярных компонентов и метаболитов микроорганизмов. Однако при этом значительно снижаются седиментационные и агглютинабельные свойства стафилококковых клеток, что не позволяет получать высокоактивные реагенты для реакций на основе РКОА. Стоит отметить, что активность по белку А, определяемая с помощью РИД, в клетках не снижается.

Использование ультрафильтрации под контролем РБИК дало возможность сконцентрировать исходную нативную микробную суспензию и провести начальный этап процесса очистки от низкомолекулярных пигментированных компонентов питательной среды. При этом активность БКР по белку А, определяемая с помощью РБИК, была выше в 2–4 раза, чем при длительной ультрафильтрации. На втором этапе этой технологической стадии применяли центрифугирование. Полученные концентраты БКР стандартизовали по оптической плотности.

Далее, с учетом масштабирования процесса, используя РБИК, были подобраны условия стабилизации суспензии стафилококка химическими агентами с последующей тепловой обработкой.

Для стабилизации стафилококковых клеток, содержащих белок А, могут быть использованы глутаровый альдегид, формалин, трихлоруксусная кислота (ТХУ). Предварительно в лабораторных условиях были испытаны варианты методов стабилизации с применением формалина и ТХУ, изучено влияние на активность белка А различных концентраций указанных стабилизирующих веществ. Параллельно отработывались условия тепловой обработки. Первоначально при выборе оптимального режима придерживались рекомендаций Kronvall G. [13], согласно которым предполагается кратковременный прогрев в течение 4–5 мин. при 80 °С. Однако было показано, что суспензии, полученные таким образом в наших условиях, недостаточно стабильны даже в течение месяца: наблюдалась коагуляция с образованием «сгустков», «тяжей» из слипшихся клеток. В связи с этим нами были проведены эксперименты по увеличению длительности инкубации при тепловой обработке. Суспензии, прогретые в течение 40–60 минут при указанной температуре, обладали достаточно высокой активностью, оставаясь стабильными в жидком виде на протяжении всего срока наблюдения (3 месяца).

В результате проведенных экспериментов нами было установлено, что использование как ТХУ, так и формалина с последующей тепловой обработкой стафилококковых клеток позволяет получить стабильный гомогенный реагент с хорошими седиментационными и агглютинабельными свойствами, обладающий достаточно высокой активностью по белку А (табл. 1).

Таблица 1

Активность БКР после стабилизации химическими агентами

Исследованный материал	№ опыта	РБИК, разведение ИК	РИД, мг IgG/1 мл 10% БКР
БКР, обработанный формалином	1	1:64	1,90
	2	1:64	1,80
БКР, обработанный ТХУ	3	1:64	1,30
	4	1:128	1,32

Для производственной технологии был доведен до оптимальных кондиций вариант, предусматривающий обработку концентрированной стафилококковой суспензии формалином в условиях постоянного перемешивания

и с дополнительным охлаждением. После удаления свободного формалина с помощью центрифугирования проводили тепловую обработку.

Таким образом, контролируя с помощью РБИК активность белка А на этапах ультрафильтрации и стабилизации с тепловой обработкой, мы усовершенствовали технологию, позволяющую получать бактериально-клеточный реагент с высокой иммуноглобулин-связывающей способностью и с оптимальными агглютинабельными свойствами. Концентрация бактериально-клеточного реагента стандартизована по массе влажного осадка стабилизированных белок А-содержащих клеток и составляет 10%.

По разработанной технологии препарат был получен в жидком и лиофилизированном виде. В качестве консервантов использованы азид натрия или мертиолят, при лиофилизации с целью предупреждения снижения активности белка А и изменений физических свойств применяли сахарозо-пептонный наполнитель в качестве криопротектора. Препараты хранили при температуре 4–10 °С. Было показано, что при хранении бактериально-клеточного реагента в жидком виде гомогенность и активность по белку А сохранялись в течение 6 месяцев (срок наблюдения). Лиофилизированный препарат быстро регидратировался с образованием гомогенной суспензии; при этом активность лиофилизированного БКР, оцениваемая с помощью РИД по иммуноглобулин-связывающей активности, не изменялась в течение 36 месяцев (срок наблюдения).

Таким образом, разработанная реакторная технология обеспечивает возможность получения стабильного при хранении препарата БКР с активным белком А.

РБИК, используемая нами для оценки белка А в суспензиях, может найти применение в производстве лечебных гетерогенных антитоксических сывороток в качестве экспрессного метода оценки специфической активности. В действующем сывороточном производстве оценка специфической активности антитоксических сывороток проводится с помощью биопробы на мышцах. Этот метод ретроспективен (результат учитывается на 3–5-е сутки). Также может использоваться реакция флоккуляции, однако она не является универсальной для определения специфической активности антитоксических сывороток различной специфичности. Кроме того, флоккулирующая способность сывороток отдельных животных может существенно различаться. Биопроба как заключительный («выпускной») метод не имеет альтернативы, но на этапах производства при оценке нативных сывороток в период иммунизации лошадей-продуцентов,

при комплектации партий сывороток для ферментализа, при контроле полноты ферментализа специфических иммуноглобулинов, при анализе очищенных антител и их фрагментов может быть использована РБИК.

Как указывалось ранее, РБИК основана на установленном нами феномене резкого повышения аффинности к белку А специфических иммуноглобулинов лошади при их соединении с гомологичным анатоксином. На большом экспериментальном материале было продемонстрировано, что с помощью этого метода можно выражать результаты титрования сывороток не только в разведениях, но и в антитоксических единицах (МЕ/мл), используя референс-сыворотки и учитывая коэффициент пересчета. В таблице 2 приведены данные по сравнительному титрованию антитоксических противостолбнячных сывороток в РБИК и реакции флоккуляции. Полученные результаты этих реакций достаточно хорошо согласуются, коэффициент корреляции составил 0,94.

Таблица 2

Титрование нативных лошадиных противостолбнячных сывороток

№ пробы сыворотки	Титр по реакции флоккуляции, МЕ/мл	Титр по РБИК	
		Разведение сыворотки	МЕ/мл*
192	300	1:1000	270
323	600	1:2750	750
341	500	1:2500	680
391	500	1:2250	610
522	400	1:2000	540
524	100	1:500	140
577	500	1:2500	680
583	900	1:3000	810
624	60	1:350	100
649	500	1:2000	540
653	80	1:400	110
961	400	1:1500	410
1007	700	1:3500	950

Примечание: * титр в МЕ/мл определен по референс-сыворотке, коэффициент пересчета К=0,27

Один из вариантов многообразного применения БКР с белком А — РКОА. Следует особо подчеркнуть, что РКОА — это реакция с иммобилизованными антителами и, следовательно, в отличие от известного аналога — реакции микроагглютинации, позволяет исследовать антигены не только корпускулярные, но и растворимые.

В Пермском НПО «Биомед» проведены исследования по применению БКР для определения раство-

римых и корпускулярных бактериальных антигенов в производстве анатоксинных препаратов (дифтерийного, столбнячного, гангренозных, ботулинических), коклюшной и гонококковой вакцин. БКР был использован при получении специфических коаггутинационных диагностикомов на основе аффинноочищенных иммуноглобулинов кролика, обладающих высоким сродством к белку А. Для выделения антител применяли иммуносорбенты на основе дианбромированной сефарозы 4В фирмы «Health Care» (Швеция). Готовили иммуносорбенты, учитывая рекомендации фирмы-изготовителя. Аффинную хроматографию проводили бесколоночным «Batch»-методом, так как он позволяет быстро и эффективно проводить стадии промывания и элюции. С целью лучшей визуализации и оптимизации учета результатов определения бактериальных антигенов в РКОА нами был проведен ряд экспериментов по окрашиванию стафилококковой суспензии. В ходе выполнения экспериментов было установлено, что наиболее подходящими реагентами для окрашивания стафилококковых клеток являются растворы метиленового синего, сафранина и бриллиантового зеленого. В контролях на гомогенность полученные окрашенные суспензии были равномерно мутными, стафилококковые клетки не образовывали визуально различимых конгломератов. В дальнейших исследованиях проводилась отработка условий приготовления специфических коаггутинационных препаратов, а также их стандартизация и оценка. Были сконструированы следующие диагностические реагенты: дифтерийный, столбнячный, гангренозный (перфрингенс, эдематический, септикум), ботулинический (тип А, Б, Е), коклюшный, гонококковый, кампилобактерный, гемоглобиновый [3–7]. Полученные диагностикомы обладали гомогенностью и не давали спонтанной агглютинации. При взаимодействии с гомологичными антигенами в реакции коаггутинации наблюдалось быстрое формирование агглютинатов.

На следующем этапе работы была изучена возможность использования РКОА в производстве иммунобиологических препаратов и в лабораторной диагностике.

Было установлено, что РКОА может быть использована для оценки токсигенности дифтерийных штаммов. Результаты определения токсина при выращивании культуры *S. diphtheriae* на среде Лингуда представлены в таблице 3. Параллельно штаммы тестировали общепринятым методом диффузионной преципитации в агаре с ферментированным очищенным специфической сорбцией дифтерийным антитоксином. В контрольных опытах ставили РКОА с бульонными культурами нетоксигенных штаммов.

Определение токсигенности штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в РКОА

Штамм	Продолжительность роста культуры (час)	Результаты индикации токсина в разведениях							Результат индикации токсина методом преципитации
		Уровень разведения культуры							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
№ 665	2	-	-	-	-	-	-	-	токсигенный штамм
	4	+	+	-	-	-	-	-	
	6	+	+	+	-	-	-	-	
	8	+	+	+	-	-	-	-	
	24	+	+	+	+	+	-	-	
№ 138	2	-	-	-	-	-	-	-	нетоксигенный штамм
	6	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	-	-	
№ 20	2	-	-	-	-	-	-	-	нетоксигенный штамм
	6	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	-	-	

Примечание: (+) – положительный результат; (-) – отрицательный результат

Из представленных данных видно, что в обеих реакциях получены сопоставимые результаты. При этом следует отметить, что РКОА протекает в течение нескольких минут, а для реакции преципитации требуется 24–48 часов.

С использованием «тормозного» варианта РКОА исследовали динамику накопления токсина при культивировании *C. diphtheriae* в реакторах. Результаты сравнительных исследований по изучению токсигенеза в РКОА и реакции флокуляции представлены на рисунке 1. С помощью обеих реакций выявлена сходная динамика накопления токсина с максимальным значением его концентрации к 42 часам культивирования. РКОА

позволяла при хорошей корреляции с данными реакции флокуляции (по динамике накопления токсина в абсолютных величинах титров) четко и оперативно следить за процессом токсинообразования непосредственно в условиях производства.

В наших исследованиях была определена возможность использования РКОА в производственном процессе при оценке полуфабрикатов очищенного дифтерийного анатоксина. Результаты титрования очищенных анатоксинов, представленные в таблице 4, свидетельствовали о возможности применения РКОА как простого экспресс-метода количественного определения анатоксина в производственных сериях.

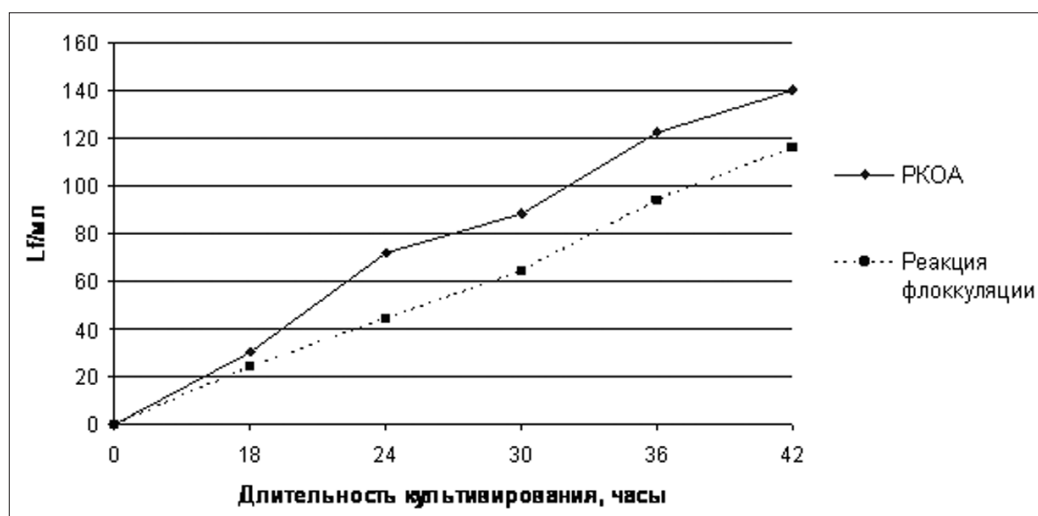


Рис. 1. Определение содержания токсина в процессе культивирования коринебактерий дифтерии штамма РW-8 вариант Массачусетс реакторным методом в реакции флокуляции и в РКОА

Таблица 4
Сравнительные данные по определению активности препаратов очищенного дифтерийного анатоксина в РКОА и реакции флоккуляции

№ серии препарата	Титр по реакции флоккуляции, Lf/мл	Титр по РКОА, Lf/мл	
		Двукратные разведения	Дробные разведения
122	430	400	450
124	420	400	430
125	420	400	430
126	410	400	430
127	410	400	430
128	410	400	420
129	410	400	420
131	400	400	420
130	420	400	450
136	470	400	500

В серии экспериментов оценивали возможность применения РКОА для оценки подлинности и полноты сорбции дифтерийного анатоксина непосредственно в составе сорбированного препарата, в частности — АКДС-вакцины. При анализе 15 производственных серий АКДС-вакцины было найдено, что полнота сорбции дифтерийного анатоксина соответствовала нормативной документации (менее 1 Lf/мл); кроме того, была достоверно подтверждена подлинность дифтерийного компонента.

Аналогично была показана возможность использования в производственном процессе реакции коагуляции со столбнячным, гангренозными, ботулиническими, гонококковым диагностическими реагентами, а также с коклюшным диагностикумом при разработке технологии получения бесклеточной коклюшной вакцины. При этом следует подчеркнуть, что ни один другой метод не может обеспечить получение результатов так же четко и оперативно, как РКОА, что особенно важно для проведения контроля целевого продукта на стадиях технологического процесса.

Особое значение применение коагуляционных препаратов приобретает в лабораторной диагностике таких инфекций, для которых бактериологический метод является основным и его использование осложнено трудностями выделения возбудителя. Коклюшная палочка, гонококк, кампилобактер очень требовательны к питательной среде и условиям выращивания. Кроме того, для постановки диагноза с помощью бактериологического метода требуется длительное время. Поэтому актуаль-

ной для этих инфекций остается проблема разработки чувствительных, специфичных и экспрессных методов диагностики.

В проведенных нами исследованиях продемонстрирована возможность применения приготовленных специфических реагентов для анализа биосубстратов от больных людей и животных при диагностике кампилобактериоза. Коагуляционные реагенты могут быть использованы для идентификации выделенных культур кампилобактеров, а также для определения кампилобактерных антигенов непосредственно в биосубстрате [5].

РКОА может быть включена в комплексную лабораторную диагностику гонореи, дифтерийной токсикоинфекции, применима для индикации коклюшных антигенов наряду с традиционными методами как дополнительный экспресс-анализ, позволяющий выявлять бактериальные антигены в первичном материале, взятом от больного, либо при подращивании в жидкой питательной среде, и при этом не требуется обязательного выделения чистой культуры возбудителя [6, 7].

В состав разработанного в Пермском НПО «Биомед» коагуляционного тест-набора для определения скрытой крови включен магнитный сорбент («Магнибас»), представляющий собой белок А-содержащие стафилококковые клетки, иммобилизованные на ферромагнитной основе [4]. Применение такого сорбента, легко и быстро осаждающегося в постоянном магнитном поле и не обладающего остаточной намагниченностью, обеспечивает двойной эффект: при этом для исключения неспецифической реакции происходит удаление иммуноглобулинов из исследуемой эмульсии кала за счет их аффинной адсорбции на магнитном белке А и их осаждения в магнитном поле, а также наблюдается соосаждение взвешенных частиц эмульсии, которые могут мешать учету результатов реакции.

Таким образом, применение РКОА в диагностических целях дает возможность определять бактериальные антигены непосредственно в биосубстрате, что является крайне важным при массовых обследованиях, так как, во-первых, упрощает процедуру исследования, во-вторых, снижает материальные затраты и позволяет в более короткие сроки исследовать большее количество проб. Использование же РКОА в совокупности с другими методами исследований обеспечивает возможность получения результатов с высокой степенью достоверности.

Данные по использованию разработанных коагуляционных диагностикумов в производстве иммунобиологических препаратов и в лабораторной диагностике обобщены в таблице 5.

Опыт использования разработанных коагутинационных диагностикумов в производстве иммунобиологических препаратов и лабораторной диагностике

Наименование диагностикума	Чувствительность диагностикума	Область применения
Гонококковый	0,54 МЕ* [0,48–0,60]	Производство вакцины Лабораторная диагностика. Идентификация штаммов, выделенных от больных. Анализ первичного материала (отделяемое уретры, цервикального канала)
Коклюшный	0,297 КЕ/мл** [0,230–0,364]	Производство вакцины. Лабораторная диагностика. Идентификация штаммов, выделенных от больных. Анализ первичного материала (смыв с заднеглоточного тампона)
Дифтерийный	0,052 Lf/мл [0,042–0,064]	Производство анатоксина. Лабораторная диагностика. Анализ первичного материала с подрашиванием, определение токсигенности бульонной культуры возбудителя дифтерии
Столбнячный	0,052 Lf/мл [0,042–0,064]	Производство анатоксина
Гангренозные (перфрингенс, эдематигенс, септикум)	0,06 ЕС/мл [0,04–0,08]	Производство анатоксинов
Ботулинические типа А, Б, Е	0,03–0,06 ЕС/мл 0,03–0,12 ЕС/мл	Производство анатоксинов Лабораторная диагностика в комплексе с ИФА. Определение токсигенности выделенной культуры возбудителя
Кампилобактерный	0,034 МЕ * [0,027–0,042]-	Лабораторная диагностика. Идентификация выделенных штаммов. Анализ первичного материала (биосубстраты животных: пробы спермы от быков-производителей и влагищной слизи коров, кал, молоко, биосубстраты человека: кал)
Гемоглибиновый (для определения скрытой крови)	3–6 мкг/мл	Лабораторная диагностика. Анализ кала на скрытую кровь

Примечание: * МЕ – международные единицы мутности; ** КЕ – коагутинационные единицы

Полученные нами результаты показали, что реакция коагутинации с разработанными диагностикумами пригодна как экспрессный метод для оперативного слежения за целевым продуктом в рамках технологического процесса при получении антигенных препаратов, а также может быть использована и в лабораторной диагностике.

Заключение

Итогом проведенных исследований явилась разработка технологии получения бактериально-клеточного реагента с белком А. Установлено, что использование для выращивания стафилококка жидкой казеиново-кислотной среды дает возможность получать суспензию

в реакторах с высоким уровнем накопления стафилококковых клеток, содержащих белок А. Подобраны условия ультрафильтрации и химической стабилизации в сочетании с тепловой обработкой, позволяющие получать БКР с высокой иммуноглобулин-связывающей способностью и оптимальными агглютинабельными свойствами. С целью контроля белка А на стадиях технологического процесса получения БКР предложена экспрессная реакция бактериосорбции иммунных комплексов. Показана возможность применения РКОА – одного из вариантов использования БКР с белком А – для мониторинга целевого продукта при производстве иммунобиологических препаратов, а также для диагностических исследований.

Литература

1. Беляя Ю.А., Вахрамеева М.С., Белый Ю.Ф., Беляя О.Ф., Петрухин В.Г. Способ получения тест-системы для определения антигенов цитотоксинассоциированных белков *Helicobacter pylori* в биологическом материале инфицированных лиц реакцией коаггутинации // Патент № 2232989 РФ, опубл. 20.07.2004.
2. Беляя Ю.А., Шеклакова Л.А., Белый Ю.Ф., Петрухин В.Г., Ружанская Т.В. Термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli* в биосубстратах больных кишечными инфекциями // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 10. – С. 35.
3. Николаева А.М., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю., Калашникова Е.А., Грязнова Д.В., Пушкарева Е.В. Новый подход к определению подлинности комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – № 2. – Вып. 2. – С. 70–74.
4. Пагнуева Л.Ю., Варфоломеева Е.В., Сперанская В.Н., Катаева Т.Н. Экспресс-метод определения скрытой крови / Материалы Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке», посвященной 105-летию Пермского научно-производственного объединения «Биомед», 17–18 июня 2003 г. – Пермь, 2003. – С. 176–179.
5. Пагнуева Л.Ю., Сперанская В.Н., Авдеева Н.С., Мехоношина Л.П., Баева Р.А. Реакция коаггутинации и иммуноферментный анализ в комплексной диагностике кампилобактериоза / Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов», посвященной 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед». 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 65–66.
6. Сперанская В.Н., Пагнуева Л.Ю., Годовалов А.П. К вопросу об экспрессной диагностике гонококковой инфекции / Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов», посвященной 110-летию филиала ФГУП «НПО «Микроген» «Пермское научно-производственное объединение «Биомед». 18–19 июня 2008 г. – Пермь, 2008. – С. 61–63.
7. Фельдблюм И.В., Сперанская В.Н., Николаева А.М., Казьянин А.В., Гореликова Е.В. Совершенствование лабораторной диагностики коклюшной инфекции // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 3. – С. 46–50.
8. Abuelzein E. Utilization of the *Staphylococcus aureus* protein A and the *Streptococcus* spp. protein G in immunolabelled techniques / Trends in Immunolabelled and Related Techniques. – Book edited by Eltayb Abuelzein, 2012. – P. 333–338.
9. Datta S.M., Janes E., Simonson J.G. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody // Clin. Vacc. Immunology. – 2008. – No. 15. – P. 1541–1546.
10. Del Rio M.L., Guitierrez C.B., Rodriguez Ferri E.F. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis* // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – No. 2. – P. 880–882.
11. Forsgren A., Sjoquist J. Protein A from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human γ -globulin // J. Immunol. – 1966. – No. 97. – P. 822–827.
12. Jesudason M.V., Balaji V., Sirinsinha S., Sridharan G. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture supernatants by coagglutination assay // Clin. Microbiol. Infect. – 2005. – No. 11. – P. 930–939.
13. Kronvall G. Rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by mean of specific antibody adsorbed to protein A-containing staphylococci // J. Med. Microbiol. – 1973. – Vol. 6. – No. 2. – P. 187–190.
14. Langone J. Complexes containing *Staphylococcus aureus* protein A: composition and biological activity // J. Biol. Response Modif. – 1984. – Vol. 3. – No. 3. – P. 241–246.
15. Lima V.M.F., Biassono L., Silva A.C., Correa A.P.F.L., Luvizotto M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs // Pesq. Vet. Brasil. – 2005. – No. 25(4). – P. 215–218.
16. Lin C.C., Yang Y.M., Chen Y.F., Yang T.S., Chang H.C. A new protein A assay based on Raman reporter labeled immunogold nanoparticles // Biosensors and Bioelectronics. – 2008. – Vol. 24. – No. 2. – P. 178–183.
17. Lindmark R., Thoren-Tolling K., Sjoquist J. Binding of immunoglobulin levels in mammalian sera // J. Immunol. Methods. – 1983. – Vol. 62. – P. 1–13.
18. Movitz J. A study of the biosynthesis of protein A in *Staphylococcus aureus* // Eur. J. Biochem. – 1974. – Vol. 48. – P. 131–136.
19. Nielsen K., Smith P., Yu W. et al. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric protein A-protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species // Vet. Microbiology. – 2004. – Vol. 101. – No. 2. – P. 123–129.
20. Ribeiro M.C.M., Araujo J.J. Coagglutination for viral DNA preparation of canine parvovirus for molecular diagnosis // J. Virol. Methods. – 2009. – No. 161. – P. 305–307.
21. Schountz T., Calisher C.H., Richens T.R. et al. Rapid field immunoassay for detecting antibody to Sin Nombre virus in deer mice // Emerging Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 13. – No. 10. – P. 1604–1607.

BACTERIAL CELL-BASED PROTEIN A REAGENT: PRODUCTION TECHNOLOGY AND EXPERIENCE IN THE USE

O.Y. SOSNINA, E.A. KALASHNIKOVA, D.V. GRYAZNOVA,
V.N. SPERANSKAYA, A.M. NIKOLAEVA

*«Biomed» – Perm Branch of the Federal State Unitary Company «Microgen»,
Ministry of Health of Russian Federation, Perm*

The technology of bacterial-cell reagent (BCR), containing protein A was developed. The reactor stage culturing *Staphylococcus aureus* Cowan strain 1, ultrafiltration and stabilization of the bacterial suspension were elaborated and optimized. We propose a rapid method of control protein A in the stages of technological process of BCR – bacteriosorbition of immune response. It was shown possibility of practical application of BCR as a natural immobilized protein A reaction co-agglutination for immunological products, as well as for laboratory diagnosis.

Keywords: bacterial cell reagent, protein A, co-agglutination.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ФЛОККУЛЯЦИИ *CHLORELLA SP.* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ

П.М. ГОТОВЦЕВ*, В.В. БУТЫЛИН, М.А. ЛОМОНОСОВА, В.А. ПАРАБИН

НБИКС Центр, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Проведен анализ существующих методов и технологий реагентного выделения водорослей из растворов, обоснован выбор микроводоросли *Chlorella sp.* в качестве объекта исследования. Изучены свойства флокулянтов на основе полиэтиленоксида и полиакриламида. Обнаружен эффект автофлоккуляции микроводоросли *Chlorella sp.* при увеличении рН до 9–10. Показано, что флокулянт на основе полиэтиленоксида отличается наибольшей эффективностью. Даны рекомендации по увеличению эффективности флоккуляции микроводоросли *Chlorella sp.*

Ключевые слова: микроводоросли, *Chlorella sp.*, флоккуляция, автофлоккуляция, полиэтиленоксид.

Введение

В настоящее время водоросли считаются наиболее перспективным ресурсом для производства биотоплива [2]. Причиной этого является то, что культуры, выращиваемые для производства биотоплив первого поколения, требуют пахотной земли, пригодной для возделывания растений и получения пищевых продуктов. В то же время выращивание водорослей возможно в совершенно различных установках — от открытых бассейнов до специализированных биореакторов. При этом совершенно не требуется занимать территории под сельскохозяйственные угодия.

Как и в случае ряда других процессов переработки органического сырья с получением моторных топлив, основной задачей для исследователей является поиск технологии, которая отличалась бы минимальными затратами энергии. В случае водорослей можно выделить два направления развития таких технологий:

- Генетическая модификация самих водорослей, в результате которой водоросли непосредственно вырабатывали бы этанол [4].

- Совершенствование процессов сбора, обезвоживания и переработки уже используемых культур водорослей.

Первое направление является более перспективным, так как позволяет исключить промежуточные ста-

дии переработки, минимизировать энергозатраты и тем самым повысить эффективность всей технологии в целом.

В то же время параллельно ведутся работы и по использованию уже известных видов водорослей, поскольку до начала активного внедрения генетически модифицированных водорослей существующие виды могут найти свою нишу в производстве биотоплива.

Сбор и обезвоживание с минимальными энергозатратами могут понизить себестоимость получаемого в итоге биотоплива. Очевидно, что технологии сбора и обезвоживания напрямую зависят от стадий дальнейшей переработки и вида водорослей. Сбор крупных водорослей, таких как *Laminaria*, существенно отличается от сбора, например, сине-зеленых водорослей. В случае последних речь идет не столько о техническом сборе, сколько о выделении из водных растворов. То есть, под рассмотрением попадают как технологии реагентного выделения, так и различные методы фильтрации. Технологии фильтрации так или иначе требуют затрат электроэнергии на перекачку фильтруемой среды, отделение водорослей от фильтрующего материала. Реагентное выделение теоретически может позволить самостоятельно выделить водоросли из раствора либо существенно упростить дальнейшие процессы фильтрации и тем самым снизить общие энергозатраты.

Таким образом, анализ возможности использования различных реагентов для выделения сине-зеленых водорослей из воды является достаточно актуальной задачей. В настоящей работе будут рассмотрены варианты использования различных реагентов для выделения *Chlorella sp.* из водного раствора.

Существующие методы и технологии по реагентному выделению водорослей из раствора. В

настоящее время в схемах очистки воды и сточных вод широко распространено использование реагентов-осадителей. Такими реагентами считаются различные коагулянты, флокулянты и биофлокулянты. К коагулянтам относятся сернокислое железо, хлорид трехвалентного железа, сернокислый алюминий, оксихлорид алюминия. В роли флокулянтов выступают композиции на основе гидрофильного полимера, например, полиакриламида (ПАА). Ныне в России в схемах обезвоживания осадков очистных сооружений хозяйственно-бытовых сточных вод получил распространение флокулянт «Сибфлок», который представляет собой композицию на основе высокомолекулярного полиэтиленоксида (ПЭО) [1].

Использование указанных коагулянтов для выделения водорослей несет в себе ряд сложностей: 1) в образовавшемся осадке будут содержаться алюминий и железо в форме гидроксидов, что окажет негативное влияние на процессы дальнейшей переработки; 2) при гидролизе коагулянтов в воде вырастет концентрация сульфатов или хлоридов в зависимости от формулы коагулянта, что может сказаться на процессах взаимодействия водорослей с окружающей средой.

В связи с этим наибольший интерес среди указанных реагентов представляют флокулянты на основе гидрофильных полимеров [7]. Надо подчеркнуть, что подобные флокулянты активно применяются для обезвоживания осадков и избытка активного ила очистных сооружений хозяйственно-бытовых сточных вод. В подобных смесях доля избыточного активного ила может достигать 40–60% в зависимости от режима работы очистных сооружений. Следовательно, флокулянты взаимодействуют с различными видами микроводорослей и простейших, участвующих в процессе биологической очистки воды. Однако переносить данный опыт непосредственно на системы по выращиванию микроводорослей для энергетических целей затруднительно в связи со следующими факторами:

- во-первых, при выращивании микроводорослей обычно стремятся к тому, чтобы избежать развития других видов в биореакторе, в то время как в активном иле очистных сооружений присутствует значительное многообразие бактерий и простейших;

- во-вторых, при выращивании микроводорослей, как правило, используется очищенная вода с добавлением питательной среды, тогда как в сточных водах имеется значительное количество различных примесей; среди последних присутствуют органические соединения, которые могут быть флокулированы, и взвешенные вещества, которые могут выступать вроде «балласта», интенсифицирующего процессы осаждения.

В то же время использование уже выпускающихся флокулянтов и для флокуляции микроводорослей может снизить себестоимость самого процесса сбора, в связи с чем применение подобных реагентов представляет значительный интерес.

В качестве биофлокулянтов могут быть использованы бактерии, диатомовые кремниевые водоросли, а также автофлокулирующие микроводоросли. Биофлокуляция микроводорослей бактериями требует дополнительного субстрата, так же, как и дополнительного источника энергии для выращивания бактерий, и это может вызывать нежелательное бактериальное загрязнение заводов, производящих водоросли. Недавно естественно флокулирующая диатомовая кремниевая водоросль *Skeletonema* была использована для образования флокулированного осадка микроводоросли *Nannochloropsis*. Так как у диатомовых водорослей клеточная стенка основана на кремнии, они требуют другого состава среды, в отличие от большинства штаммов микроводорослей, используемых для производства биодизеля, что приводит к дополнительным расходам на культивирование.

Метод биофлокуляции флокулирующими микроводорослями позволяет извлекать микроводоросли без введения химических флокулянтов и повторно использовать питательную среду без ее дополнительной обработки. Другим преимуществом используемого в данном методе флокулянта по сравнению с другими применяемыми флокулирующими микроорганизмами (бактерии, диатомовые водоросли) является то, что он не требует других условий культивирования и, следовательно, метод лишен дополнительных затрат и нежелательных загрязнений [5].

Помимо указанных выше реагентов-осадителей, сейчас проводятся исследования по использованию хитозана в качестве флокулянта [3]. Преимуществом данного реагента является то, что он представляет собой биологическое соединение и не оказывает существенного влияния на процессы дальнейшей переработки водорослей. Основным недостатком реагента состоит в том, что он эффективен при низких рН, в то время как, например, рН среды при выращивании *Chlorella sp.* находится в диапазоне приблизительно от 7 до 8.

Отдельно следует отметить эффект автофлокуляции, который возникает при увеличении рН среды выше 9–10. Увеличение значения рН среды повышает эффективность флокуляции до 90% у пресноводных микроводорослей (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.*) с низкой/средней концентрацией биомассы и у морских микроводорослей (*Nannochloropsis*

oculata, *Phaeodactylum tricornutum*) [8]. Так, в работе [6] отмечается, что данный эффект для *Phaeodactylum tricornutum* наблюдается уже при рН, равном 9.

Тем не менее в целом в настоящее время отсутствуют определенные критерии по подбору флокулянтов для различных видов микроводорослей, сам механизм их флокуляции остается недостаточно изученным. Также необходимо оценить эффективность новых флокулянтов, созданных на основе различных гидрофильных полимеров при флокуляции микроводорослей.

Материалы и методы

Выбор объекта исследования и методика проведения эксперимента. В качестве объекта исследования была выбрана *Chlorella sp.* Выбор данной микроводоросли обусловлен следующим: 1) относительно небольшие размеры; 2) широкая распространенность и активное использование в различных научно-технических приложениях.

Основной задачей работы является оценка эффективности флокулирующего действия трех различных флокулянтов, применяющихся при очистке сточных вод. При этом необходимо оценить, в первую очередь, эффективность флокулянтов на основе ПЭО и сопоставить ее с эффективностью флокулянтов на основе ПАА. В качестве флокулянтов были выбраны:

- Анионный флокулянт Superfloc A-100.
- Катионный флокулянт Floram FO4550SH.
- Флокулянт «Сибфлок» на основе высокомолекулярного ПЭО, также проявляющий катионные свойства.

Такой выбор флокулянтов позволяет охватить основные типы реагентов, использующихся при очистке сточных вод и обезвоживании осадков очистных сооружений хозяйственно-бытовых сточных вод.

При проведении эксперимента оценивалась флокулирующая способность каждого из указанных реагентов. Также проводилась оценка скорости влагоотдачи и эффективности последующей фильтрации среды для проб, в которые дозировались флокулянты, и для пробы без флокулянтов. Параллельно проводилось определение рН среды, при котором активно протекает автофлокуляция *Chlorella sp.*

Дозировка была выбрана одинаковой для всех реагентов — так, чтобы концентрация активного вещества составляла 0,5%. Выбор дозировки обусловлен эффективными концентрациями данных реагентов при их дозировании в системах обезвоживания осадков очистных сооружений хозяйственно-бытовых сточных вод.

В данной работе не ставилась цель определения токсичности выбранных реагентов для *Chlorella sp.* в связи с тем, что многие из существующих технологий переработки полученной биомассы не связаны с их жизнедеятельностью. Для каждого опыта объем пробы раствора *Chlorella sp.* составлял 100 мл. После добавления флокулянта осуществлялось перемешивание в течение 1 минуты для интенсификации процесса образования флоккул.

Эффективность последующего фильтрования определялась путем фильтрования проб через беззольный фильтр (тип «синяя лента») на воронке Бюхнера, далее оценивалась прозрачность фильтрата. Данный метод позволяет также косвенно оценить и эффективность флокуляции в связи с тем, что крупные флоккулы останутся на фильтре. Протекание процесса контролировалось по мутности пробы фильтрата.

При проведении исследований с ПЭО также контролировалась вязкость воды, поскольку этот флокулянт при принятых для эксперимента дозировках оказывает существенное влияние на данный параметр. Измерения проводились на вибровискозиметре SV-10 компании «A&D» (диапазон измерений — 0,3–10000 мПа·с, погрешность — 3%).

Результаты

На рисунке 1 показаны результаты фильтрации раствора *Chlorella sp.* с флокулянтом (слева) и без флокулянта. Очевидна существенная разница в прозрачности, а также видно выпадение в осадок проскочивших частиц.

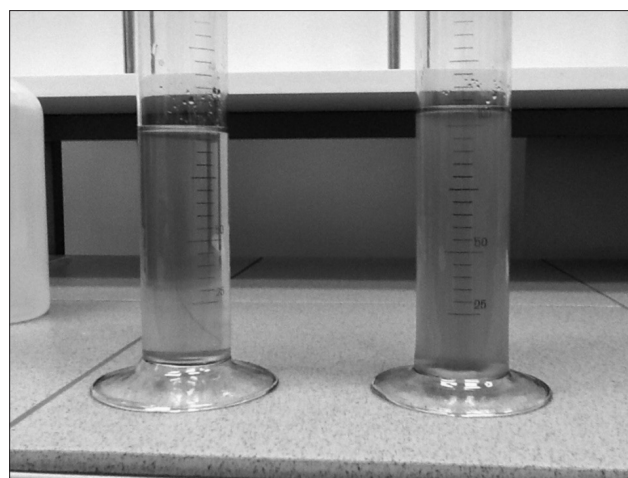


Рис. 1. Фильтрат после фильтрования растворов: слева — раствор *Chlorella sp.* с флокулянтом «Сибфлок»; справа — чистый раствор *Chlorella sp.* (различие более заметно в цвете)

Изменение вязкости сред подтверждается результатами наблюдений. Вязкость исходного раствора была примерно равна вязкости воды при той же температуре (во время эксперимента ее величина была 21 °С) и составляла 1,00–1,02 мПа·с: после добавления флокулянта она стала равна 1,25 мПа·с. После протекания процесса флокуляции и фильтрования по указанной выше схеме вязкость фильтрата составила 1,00–1,05 мПа·с. Данные

колебания вязкости характеризуют практически полное расходование флокулянта на процесс флокуляции. В то же время полного осветления не было достигнуто, время осаждения флоккул также было невелико.

На рисунке 2 показаны фильтры после проведения процесса фильтрования: слева — раствора после дозирования флокулянта «Сибфлок», справа — без флокулянта.



Рис. 2. Фильтры после фильтрования растворов: слева — раствор *Chlorella sp.* с флокулянтом «Сибфлок»; справа — чистый раствор *Chlorella sp.*

Мутность фильтрата сразу после проведения эксперимента составила 27 ЕМФ (Единицы мутности по формазину), после 8 часов отстаивания она снизилась до 12 ЕМФ.

Также было проведено изучение флоккул, отфильтрованных на фильтрах, с использованием оптического

микроскопа с увеличением в 4 и 10 раз. Как следует из снимков, представленных на рисунках 3 и 4, применение флокулянта «Сибфлок» приводит к образованию агрегатов сине-зеленых водорослей значительных размеров, что положительно сказывается на скорости седиментации и на выделении биомассы фильтрованием.

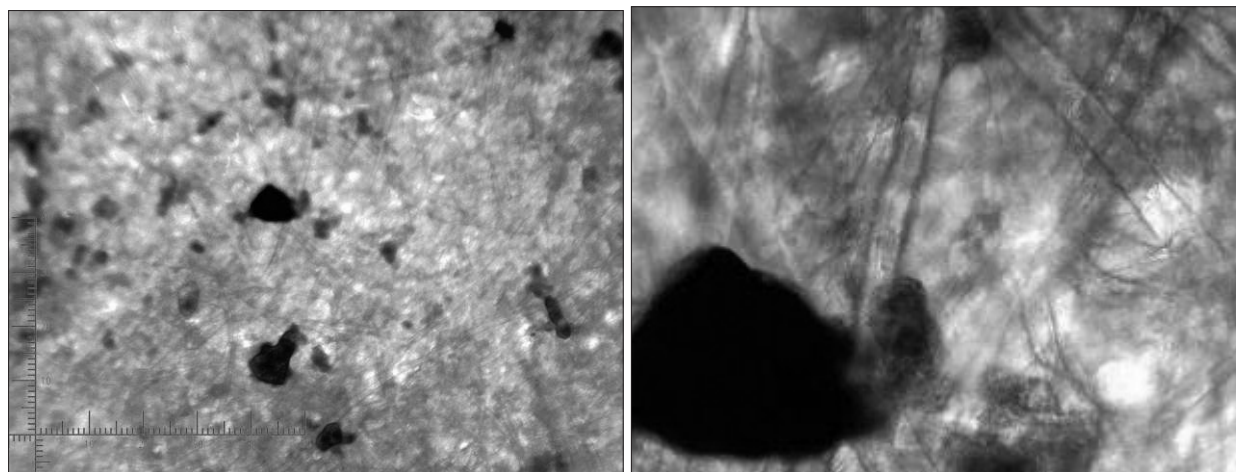


Рис. 3. Чистый раствор *Chlorella sp.*: слева — увеличение в 4×; справа — увеличение в 10×

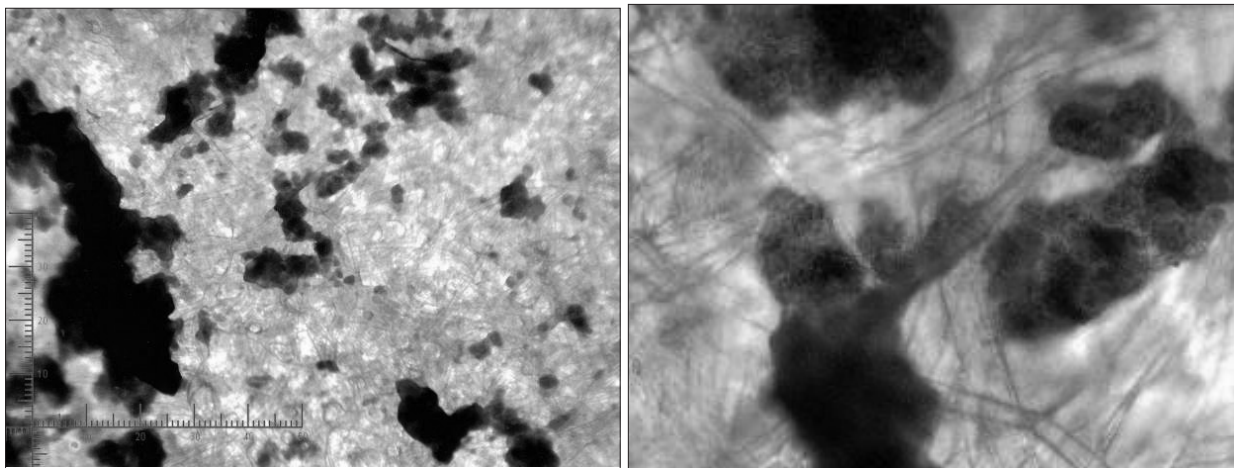


Рис. 4. Раствор *Chlorella sp.* с флокулянтom «Сибфлок»:
слева — увеличение в 4×,
справа — увеличение в 10×

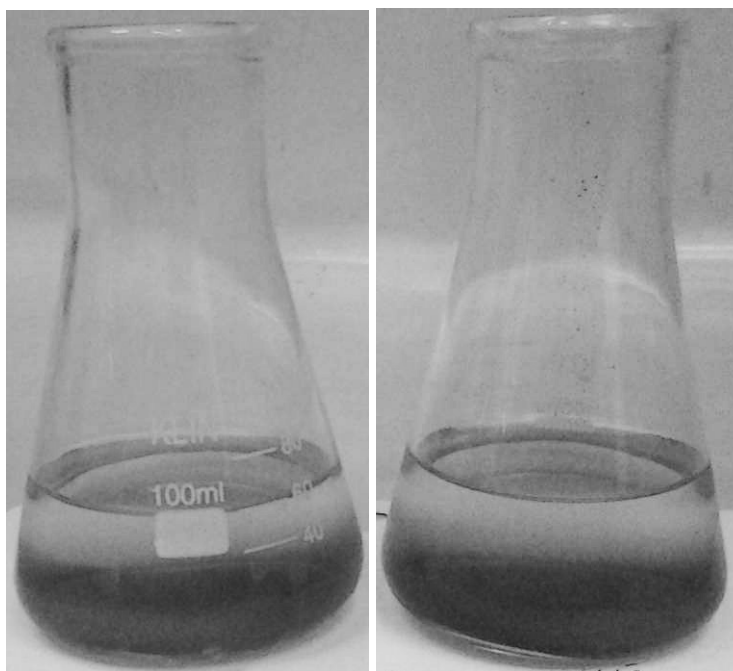


Рис. 5. Раствор *Chlorella sp.* с флокулянтами:
слева — Superfloc A-100;
справа — Floam FO4550SH

На рисунке 5 показаны результаты флокуляции с использованием флокулянтов Superfloc A-100 и Floam FO4550SH после 8 часов отстаивания. Как видно из этого рисунка, в обоих случаях флокуляция прошла эффективно, отчетливо виден образовавшийся слой осадка.

Однако скорость флокуляции была различна: в случае анионного флокулянта она была выше, что подтверждается результатами фильтрования смеси через фильтр после 30 секунд перемешивания. Фотографии

фильтров представлены на рисунке 6. Видно, что в случае анионного флокулянта в этих условиях флокуляция начиналась практически сразу; в то же время в случае катионного флокулянта выбранного времени перемешивания оказалось недостаточно. Для проверки достоверности данного вывода растворы с продозированным флокулянтom отстаивали в течение 8 часов, после чего проводили измерения мутности. Было найдено, что в случае анионного флокулянта мутность составила 25 ЕМФ, в случае катионного — 17 ЕМФ.

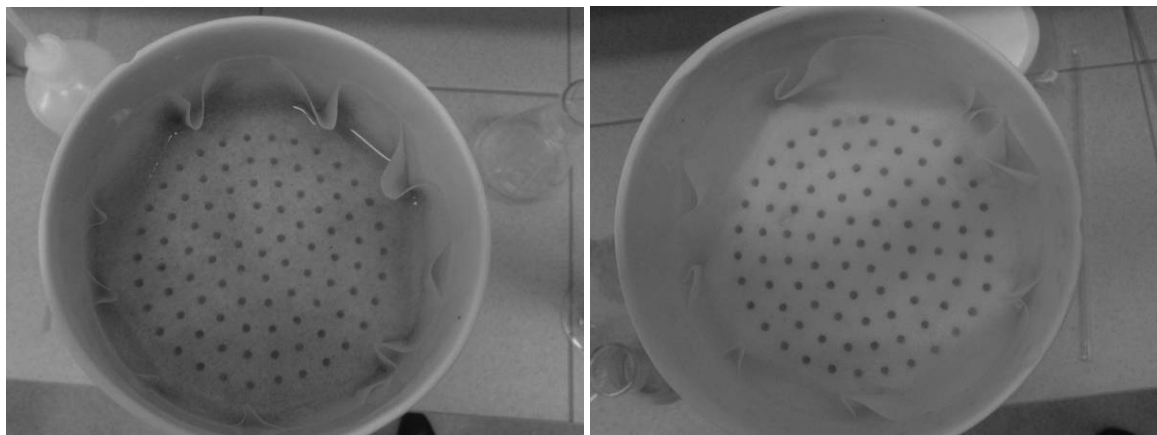


Рис. 6. Фильтры после фильтрования растворов:
слева — раствор *Chlorella sp.* с флокулянтom Superfloc A-100,
справа — с флокулянтom Floрам FO4550SH

Таким образом, можно сделать вывод, что при условиях проводимого эксперимента использование катионного флокулянта Floрам FO4550SH позволяет добиться большей эффективности. В то же время применение анионного флокулянта Superfloc A-100 отличается большей скоростью образования флоккул.

Эффект автофлокуляции для *Chlorella sp.* начинает наблюдаться при росте рН свыше 9–10 и при увеличении рН более 11 практически не изменяется. Мутность раствора после осаждения составила 35 ЕМФ.

Обсуждение

Результаты проделанной работы свидетельствуют о том, что использование указанных флокулянтов позволяет осуществить флокуляцию *Chlorella sp.* Измерения мутности подтверждают, что флокулянт «Сибфлок» на основе высокомолекулярного ПЭО отличается наибольшей эффективностью. Данные показатели объясняются большей молекулярной массой применявшегося гидрофильного полимера и большим размером образовавшихся флоккул. В то же время опыты со всеми тремя флокулянтами продемонстрировали, что время осаждения образовавшихся флоккул достаточно велико. Мутность менее 50 ЕМФ достигалась только после длительного отстаивания либо фильтрования. При этом следует отметить, что использовались дозировки, близкие к тем, которые применяются при очистке сточных вод. Отчасти повысить эффективность флокуляции можно за счет подбора более точной дозировки реагента и совместной корректировки рН в щелочную область для интенсификации явления автофлокуляции. Также немаловажными факторами для флокуляции являются

температурный режим процесса и эффективность перемешивания флокулянта со средой.

С другой стороны, как уже упоминалось, все используемые флокулянты разрабатывались для систем, содержащих различные органические примеси, взвешенные вещества и биоценоз. Для систем микроводоросли/вода, которые имеются в биореакторах, наибольшей эффективностью отличалась бы специальная композиция, которая создавалась бы с учетом особенностей обрабатываемой среды. Как следует из проведенной работы, при выборе компонентов подобного флокулянта не стоит ограничиваться наиболее распространенными решениями, а необходимо рассмотреть максимально возможный спектр потенциально флокулирующих веществ.

Также надо отметить недостаточную изученность явления флокуляции микроводорослей и факторов, на него влияющих. Изучение данного явления может существенно помочь в разработке флокулянта, ориентированного на флокуляцию микроводорослей.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе осуществлен анализ технологий реагентного выделения водорослей из растворов и дано обоснование выбора микроводоросли *Chlorella sp.* в качестве объекта исследования. Были изучены характеристики флокулянтов на основе полиэтиленоксида и полиакриламида. Показан эффект автофлокуляции микроводоросли *Chlorella sp.* при увеличении рН до 9–10. При этом наблюдалось, что флокулянт на основе полиэтиленоксида отличается наибольшей эффективностью. Представлены рекомендации по увеличению эффективности флокуляции микроводоросли *Chlorella sp.*

Литература

1. Похил Ю.Н., Багаев Ю.Г., Иванов Н.А., Иванов А.Н. Инновационная технология обезвоживания осадков сточных вод на иловых площадках // Водоснабжение и санитарная техника. – 2011. – № 4. – С. 58–64.
2. Abercade – исследования, представленные на Интернет-странице: <http://www.abercade.ru/research/analysis/2314.html>.
3. Chang Y-R. and Lee D-J. Coagulation-membrane filtration of *Chlorella vulgaris* at different growth phases // Drying Technol. – 2012. – Vol. 30. – No. 11–12. – P. 1317–1322.
4. Deng M-D., Coleman J.R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 523–528.
5. Salim S., Bosma R., Vermue M.H., Wijffels R.H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation // J. Appl. Phycol. – 2011. – Vol. 2. – P. 849–855.
6. Spilling K. et al. Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation // J. Appl. Phycol. – 2011. – Vol. 23. – P. 959–966.
7. Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production // Trends in Biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – No. 4. – P. 233–239.
8. Wu Z., Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y., Li A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium // Bioresource Technology. – 2012. – Vol. 110. – P. 496–502.

INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF FLOCCULATION *CHLORELLA SP.* USING A VARIETY OF METHODS

P.M. GOTOVTSEV, V.V. BUTYLIN, M.A. LOMONOSOVA, V.A. PARABIN

NBICS Center, Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

The analysis of existing methods and technologies of reagent isolation of algae from the solutions was carried out. The proofs for a choice of the micro-alga *Chlorella sp.* as the object of study were adduced. The properties of flocculants based on polyethylene oxide and polyacrylamide were studied. The effect autoflocculation micro-algae *Chlorella sp.* by increasing the pH to 9–10 was revealed. It was shown that on the basis of polyethylene oxide flocculant has the greatest efficiency. The recommendations to increase the efficiency of flocculation of micro-algae *Chlorella sp.* were done.

Keywords: micro-algae, *Chlorella sp.*, flocculation, autoflocculation, polyethylene oxide.

РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ НУТРИЕНТЫ. СООБЩЕНИЕ 1: СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ БИОМАССЫ ИЗ БИОЦЕНОЗОВ МОЛОКА

ЧАН ВАН ТИ, Л.А. ГУЛИМОВА, НГУЕН ЧЫОНГ ЗАНГ, К.В. ГОРИН, Е.Г. БОРИСЕНКО*

*ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств»
Министерства образования и науки Российской Федерации, Москва*

Работа состоит из трех частей (сообщений). В настоящей первой части были исследованы возможности выделения дрожжей и лактобактерий из такого универсального продукта питания, как молоко млекопитающих, и использования этих микроорганизмов при твердофазной ферментации (ТФФ) растительного сырья. Выявлена способность этих дрожжей, и прежде всего дрожжей рода *Pichia* из женского грудного молока, интенсивно накапливать биомассу на твердых негидролизированных целлюлозосодержащих субстратах. Отмечены некоторые закономерности взаимодействия дрожжей и лактобактерий при ТФФ.

Ключевые слова: молоко млекопитающих, дрожжи, бактерии, растительное сырье, биоконверсия, микробные нутриенты.

Введение

У современного семимиллиардного населения Земли есть ряд проблем, связанных с питанием. В целом ряде развивающихся стран в рационе людей крайне высок дефицит высокоценного белка, сбалансированного по незаменимым аминокислотам (не менее 20 млн. т в год) [2]. Если же учесть дефицит белка в кормах для животных, то общий дефицит белка на начало XXI века еще в конце прошлого века прогнозировался в масштабах 60–65 млн. т в год [10]. Причем, производство традиционных продуктов питания и кормов для животных растет слабо, периодически оно даже падает из-за стихийных бедствий.

Недавно созданный международный проект Билла и Мелинды Гейтс «Суперъеда» предполагает эффективно решать проблему голода с помощью генномодифицированных сортов маниока, сорго, кукурузы [12]. Однако новые продукты не являются высокобелковыми, да и белки их по содержанию незаменимых аминокислот

все-таки весьма далеки от эталона (животного белка). К тому же эти культуры районированы для тропических регионов, а их модифицированный геном вызывает определенные опасения у значительной части человечества. Нужны более эффективные натуральные обогатители пищи и кормов не растительного происхождения, например, микробные.

Еще одной общей проблемой человечества являются нарушения микробиоценозов желудочно-кишечного тракта человека и животных. Возбудителями быстро нарастающего числа желудочно-кишечных заболеваний очень часто становятся условно патогенные бактерии, приобретающие плазмиды токсигенности, колонизационной резистентности и антибиотикоустойчивости. Все человечество становится все менее защищенным перед этой угрозой, о чем свидетельствуют вспышки бактериальных токсикоинфекций с весьма тяжелыми исходами даже в относительно благополучной Европе в 2011 и 2012 годах [7].

В естественных условиях примером очень эффективного решения обеих этих проблем является функционирование рубца дигастричных животных. Новорожденный теленок, у которого еще не сформировалась микрофлора рубца, абсолютно нуждается в материнском молоке, так как оно служит для него и нутрицевтиком (источником жизненно важных питательных веществ) и парафармацевтиком, защищающим теленка в первые 1–2 месяца жизни от возбудителей инфекционных желудочно-кишечных болезней. По мере формирования микрофлоры рубца, нарастающей на растительном сырье *in vivo*, функции нутрицевтиков и парафармацевтиков в

© 2013 г. Чан Ван Ти, Гулимова Л.А., Нгуен Чыонг Занг, Горин К.В., Борисенко Е.Г.

* Автор для переписки:

Борисенко Евгений Георгиевич

д.т.н., профессор

Московский государственный университет пищевых производств
Минобрнауки России

125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11

Тел.: +7 (916) 810-19-07

E-mail: biotech@mgpp.ru

значительной степени связываются с этой микрофлорой [6, 11]. Именно этот принцип мы предлагаем использовать при производстве новых продуктов питания и кормов *in vitro* на базе микробной биоконверсии растительного сырья, как сельскохозяйственного, так и дикорастущего.

Исследование данной проблемы выполнялось в виде трех взаимосвязанных блоков. Результаты оформлены как три последовательных сообщения в журнале «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова». Ниже приводится первая часть этой серии статей.

Материалы и методы

Ввиду того, что микрофлора молока млекопитающих играет доминирующую роль в формировании микробиоценозов желудочно-кишечного тракта, молоко разных видов млекопитающих и человека было использовано как возможный источник микроорганизмов-продуцентов биомассы на растительном сырье. В качестве производственных культур для биоконверсии растительного сырья были использованы дрожже-бактериальные ассоциации, выделенные из коровьего, козьего, свиного молока, а также из образцов женского грудного молока, отобранных во Вьетнаме, Китае и в России.

В качестве среды накопления для бактерий, выделяемых из молока, было использовано само молоко, инкубируемое при 37 °С 24–72 часа. На агаровых средах получали изолированные колонии и чистые культуры лактобактерий. В качестве среды накопления для дрожжей, содержащихся в молоке, использовали пшеничные отруби, которые увлажняли испытуемым молоком до 50–55%-ной влажности. Для подавления активности бактерий в молоко добавляли гентамицин в количестве 50 мкг/мл. После инкубации в аэробных условиях при температуре 28–32 °С на агаровых средах выделяли чистые культуры дрожжей и оценивали их продуктивность по накоплению дрожжей на твердых растительных субстратах в соответствии с ГОСТ 10444.12-88. В связи с тем, что культивирование дрожжей вели на гетерогенных растительных питательных средах, оценку активности их роста вели прямым подсчетом клеток в культурах на твердых и жидких питательных средах.

Твердофазную ферментацию (ТФФ) на отрубях и на других целлюлозосодержащих субстратах проводили в чашках Петри и в качалочных колбах при высоте слоя 1–3 см и влажности субстрата 50–55%. Идентификацию активных дрожжей проводили по общепринятой методике [1] согласно определителям дрожжей. Идентификацию

дрожжей до вида проводили методом ПЦР-анализа [5]. Ксиланазную и экзоглюконазную активности определяли по накоплению редуцирующих сахаров [4].

Результаты и обсуждение

Инкубирование молока различных видов млекопитающих в термостате при 37 °С и пересев петлей после его свертывания на пластины агара позволяет в 100% случаев получать изолированные колонии, а из них на скошенном агаре — чистые культуры бактериальных изолятов.

Получение же дрожжей — активных продуцентов биомассы на растительном сырье — представляет значительно большие проблемы. В микробных ценозах молока млекопитающих абсолютно доминируют лактобактерии, которые способны в большей или меньшей степени ингибировать дрожжи и даже использовать их в качестве ростового фактора. По этой причине необходимо введение в исследуемые образцы молока антибактериальных антибиотиков. В таблице 1 достаточно четко видны преимущества выделения дрожжей из женского грудного молока в присутствии антибиотика гентамицина. Однако этот процесс весьма эффективен только со стационарным грудным молоком. Именно из него достаточно часто выделяются дрожжевые культуры в присутствии антибиотика. Выделение дрожжей из молозива мы считаем не очень рациональным из-за низкой частоты позитивных результатов с этим материалом. Тем не менее при неудачном результате в начале лактации процедуру выделения можно повторить через 4–5 недель. Совершенно вне конкуренции в этом плане стоит коровье молоко, выделяемость дрожжей из которого достигает почти 100% как с антибиотиком, так и без него. Поэтому эта категория дрожжей представляет определенный интерес ввиду легкости их выделения из молока.

Отбор дрожжевых культур, наиболее продуктивных по накоплению биомассы на растительном сырье, проводится методом твердофазной ферментации, традиционным для стран Юго-Восточной Азии. Обычно в этом методе используют чаще всего мицелиальные грибы, их смеси или еще более сложные ассоциации грибов, актиномицетов, дрожжей и бактерий [3]. В этом случае процесс ферментации может быть довольно длительным (иногда до нескольких недель), а конечный продукт по составу бывает весьма переменчивым. При работе с дрожжами эти недостатки можно в значительной степени обойти. В таблице 2 представлена выборка из наиболее продуктивных дрожжевых культур, выделенных из молока млекопитающих и человека в разных странах.

Таблица 1

Выделяемость дрожжей из натурального молока на пшеничных отрубях

№ п/п	Источник дрожжей	Количество исследованных образцов	Количество выросших дрожжевых культур			
			на отрубях с антибиотиком		на чистых отрубях	
			Положительные результаты	%	Положительные результаты	%
1	Натуральное коровье молоко	31	30	96,7	29	93,5
2	Женское молозиво	43	3	6,97	2	4,65
3	Женское грудное молоко стационарное	32	25	78,1	15	46,87

Таблица 2

Продуктивность дрожжей из натурального молока разных млекопитающих на пшеничных отрубях

№ п/п	Источник выделения	Продуктивность – 10 ⁹ клеток/г		
		24 ч	48 ч	72 ч
1	2	3	4	5
1	Коровье молоко (Россия)	0,2	1,4	2,5
2	Коровье молоко (Россия)	0,4	0,9	2,1
3	Коровье молоко (Россия)	1,25	2,1	2,9
4	Коровье молоко (Россия)	2,4	3,1	3,3
5	Коровье молоко (Россия)	2,5	3,3	3,6
6	Коровье молоко (Россия)	1,2	2,3	3,6
7	Коровье молоко (Россия)	1,2	1,8	2,9
8	Козье молоко (Россия)	0,28	0,7	1,5
9	Айран (Россия)	1,0	1,7	1,8
10	Кефир (Россия)	0,8	1,7	1,2
11	Свиное молоко (Вьетнам)	3,3	4,3	5,0
12	Свиное молоко (Вьетнам)	2,0	4,0	4,1
13	Свиное молоко (Вьетнам)	1,8	4,5	4,7
14	Свиное молоко (Вьетнам)	2,3	4,1	3,8
15	Свиное молоко (Вьетнам)	1,7	4,5	4,3
16	Свиное молоко (Вьетнам)	1,9	5,0	4,7
17	Свиное молоко (Вьетнам)	2,5	4,2	5,0
18	Свиное молоко (Вьетнам)	1,7	4,3	5,0
19	Свиное молоко (Вьетнам)	1,7	4,0	5,1
20	Свиное молоко (Вьетнам)	1,7	4,5	4,2
21	Женское грудное молоко (Вьетнам, провинция)	2,5	2,8	2,7
22	Женское грудное молоко (Вьетнам, провинция)	1,0	1,1	1,4
23	Женское грудное молоко (Вьетнам, провинция)	1,2	1,7	2,7
24	Женское грудное молоко (Вьетнам, провинция)	1,0	1,1	1,0
25	Женское грудное молоко (Вьетнам, провинция)	1,1	1,2	1,2
	Женское грудное молоко (Вьетнам, Ханой)			
26	<i>Pichia guilliermondii</i> V5-1	2,6	4,7	5,1
27	<i>Pichia sp.</i> V7b	1,7	4,4	5,0
28	<i>Pichia sp.</i> V9b	2,1	4,5	4,9
29	<i>Pichia sp.</i> V10d	1,8	4,4	4,6
30	<i>Pichia sp.</i> VR1	2,4	3,9	4,7
31	Женское грудное молоко (КНР, провинция)	0,7	0,7	0,5
32	Женское грудное молоко (КНР, провинция)	2,1	2,0	1,8
33	Женское грудное молоко (КНР, провинция)	0,4	0,5	0,4
34	Женское грудное молоко (КНР, провинция)	0,8	1,6	1,5
35	Женское грудное молоко (КНР, провинция)	1,5	1,5	1,7
36	Женское грудное молоко (КНР, провинция)	2,0	1,5	1,2
	Женское грудное молоко (Россия, Москва)			
37	<i>Pichia guilliermondii</i> J1	2,3	4,1	3,9
38	<i>Pichia anomala</i> P1	2,9	4,6	5,0
39	<i>Pichia anomala</i> 9a	3,6	5,2	5,4
40	<i>Pichia anomala</i> 9b	2,9	4,6	4,9
41	<i>Pichia anomala</i> 19	3,0	4,1	3,8

Из данных таблицы 2 видно, что дрожжи практически можно выделить из молока различных видов млекопитающих, однако продуктивность этих дрожжей имеет тенденцию к нарастанию в зависимости от вида млекопитающих: дигастричные — моногастричные — человек. Что касается женского грудного молока, то, согласно полученным нами результатам, наиболее продуктивны дрожжи, выделенные из молока обитателей городов. Еще одна важная деталь ТФФ — это видовая принадлежность отобранных продуцентов. Практически все они принадлежат к роду *Pichia*, которому современная микробная биотехнология прогнозирует очень серьезные перспективы из-за высокой биохимической активности этих дрожжей [6, 9].

Обычно выращивание дрожжей ведут на питательных средах, богатых редуцирующими веществами. Введение в среды трудноферментируемых целлюлозо-содержащих компонентов не оказывает выраженного стимулирующего влияния на рост дрожжей. Поэтому представленные в таблице 3 сравнительные данные на сахарном тростнике с сеной мукой выглядят очень демонстративно, наглядно показывая роль целлюлозо-содержащих компонентов как стимуляторов роста дрожжей.

Параллельным культивированием на различных комплексных растительных субстратах в качестве рабочего отобран штамм дрожжей *Pichia anomala* 9a (табл. 4).

Таблица 3

Продуктивность отселекционированных дрожжей на питательных средах из сахарного тростника и сеной муки

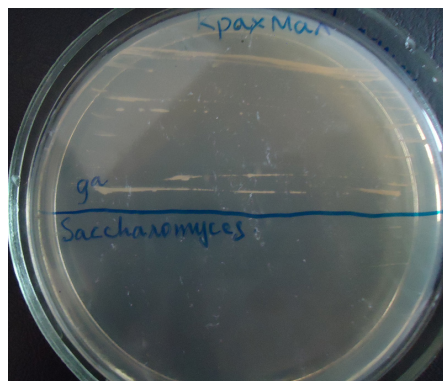
№ п/п	Штамм дрожжей	Продуктивность дрожжей, $\times 10^9$ клеток/г					
		на сахарном тростнике			на сахарном тростнике с сеной мукой (3:2)		
		24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1	<i>Pichia guillermondii</i> J1	1,2	2,4	2,0	0,3	0,9	1,0
2	<i>Pichia anomala</i> 9a	2,8	3,5	3,0	4,6	8,0	8,0
3	<i>Pichia anomala</i> 9b	1,8	2,4	2,7	4,4	5,4	5,0
4	<i>Pichia anomala</i> P1	1,9	2,0	2,3	4,1	6,2	6,4
5	<i>Pichia anomala</i> 19	1,3	2,5	2,8	6,4	6,6	7,5
6	<i>Pichia guillermondii</i> V5-1	2,1	3,0	3,0	5,6	7,8	8,4
7	<i>Pichia</i> sp. V7b	1,2	1,4	1,5	5,5	6,2	6,2
8	<i>Pichia</i> sp. V9b	1,3	2,2	2,0	4,8	7,8	8,6
9	<i>Pichia</i> sp. V10d	1,0	1,1	0,9	4,8	6,6	6,2
10	<i>Pichia</i> sp. VR1	1,8	1,8	1,7	5,5	8,0	7,8

Таблица 4

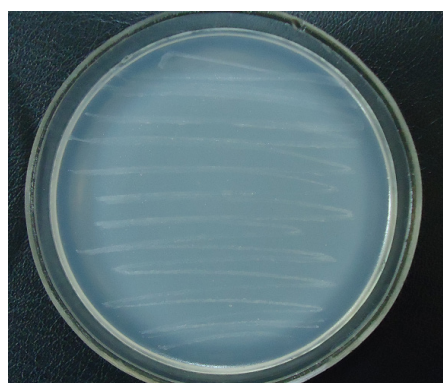
Продуктивность отселекционированных дрожжей на различных комплексных растительных субстратах

№ п/п	Штамм дрожжей	Продуктивность накопления биомассы ТФФ (в 48 ч), $\times 10^9$ клеток/г			
		Тростник + сеной мука (1:1)	Тростник + рисовая мучка (1:1)	Сахарная свекла + сеной мука (1:1)	Сладкая виноградная выжимка + отруби (1:1)
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,4	0,5	-	-
2	<i>Saccharomyces boulardii</i>	0,5	0,4	-	-
3	<i>Pichia anomala</i> 9a	8,0	10,0	7,2	8,1
4	V5-1	8,2	9,2	6,5	7,8
5	19	6,2	7,8	5,8	4,5
6	P1	5,6	6,0	4,2	5,0
7	V7b	6,2	6,5	4,5	5,0
8	V9b	7,2	6,0	4,8	6,4
9	V10d	6,2	6,0	3,6	4,5

Чтобы понять природу этого свойства данной рабочей культуры, она высевалась параллельно с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* на пластинках агара с минимальной солевой средой М-9, в которую в количестве 2% добавлялся растворимый крахмал. На рисунке 1а и 1б видна четкая разница между этими дрожжами — отсутствие роста на секторе сахаромикетов и рост *Pichia anomala* 9а на его секторе и на дополнительной чашке со средой М-9 с крахмалом. Конечно, это демонстрация качественная.



а



б

Рис.1. а — *Pichia anomala* 9а и *Saccharomyces cerevisiae* на среде М-9 с крахмалом; б — *Pichia anomala* на среде М-9 с крахмалом

На рисунках 2 и 3 представлены результаты и количественного определения экзоглюканазы и ксиланазы при росте дрожжей. Все это подтверждает представления о высокой биохимической активности дрожжей *Pichia* и свидетельствует о перспективности производственного использования дрожжей *Pichia* из молока вообще и из грудного молока, в частности.

Наряду с дрожжами в молоке присутствуют и лактобактерии, которые также достаточно просто можно получать в чистых культурах. И здесь, естественно, встает вопрос, какие закономерности будут характеризовать взаимодействие этих микроорганизмов в искусственных ассоциациях на растительных субстратах.



Рис. 2. Экзоглюканазная активность дрожжей *Pichia anomala* 9а при ТФФ на сенной муке

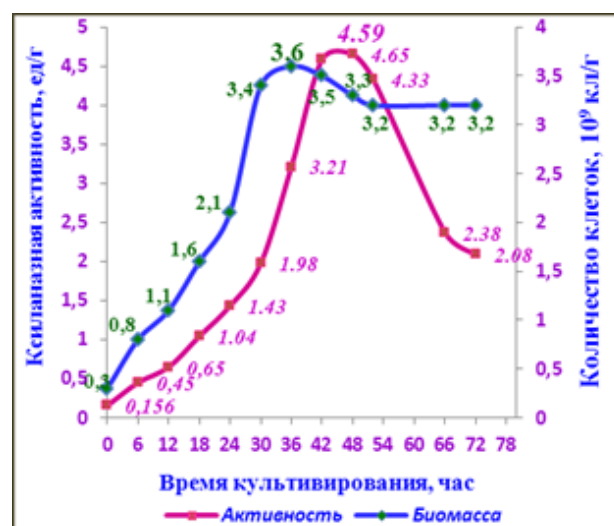


Рис. 3. Ксиланазная активность дрожжей *Pichia anomala* 9а при ТФФ на сенной муке

На рисунке 4 достаточно четко видно, что далеко не каждая культура лактобактерий может успешно ассоциироваться с дрожжами. Некоторые из них могут стимулировать рост дрожжей *P. anomala* 9а (например, штаммы В4 и В6), другие же довольно заметно этот рост ингибируют. Поэтому при формировании ассоциации нужно либо очень тщательно подбирать пары для совместного роста, либо искать другие варианты культивирования, позволяющие успешно реализовать биологический потенциал каждого члена ассоциации.

Заключение

Таким образом, из натурального молока млекопитающих (животных и человека), наряду с лактобак-

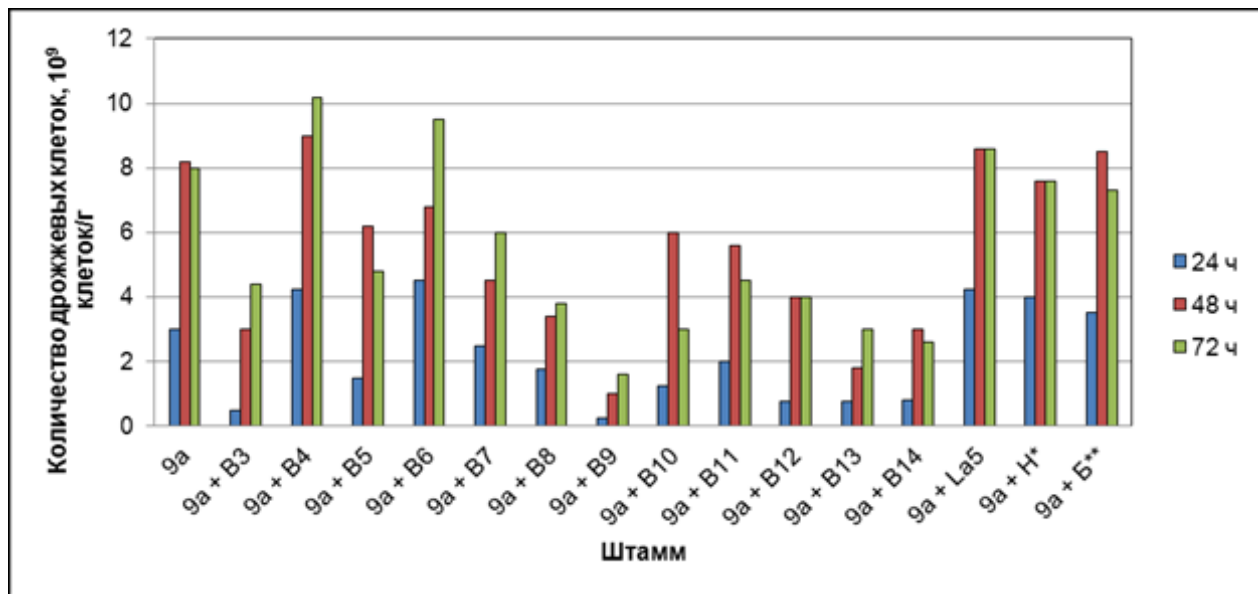


Рис. 4. Влияние разных лактобактерий на рост дрожжей *Pichia anomala* 9a

териями могут быть выделены дрожжи, прежде всего, относящиеся к роду *Pichia*, обладающие способностью утилизировать полисахариды и интенсивно накапливающие биомассу на негидролизированных твердых растительных субстратах. При совместном выращивании бактерий и дрожжей на растительных субстратах возможно как стимулирование, так и ингибирование роста дрожжей, что следует учитывать при дрожже-бактериальной био-конверсии растительного сырья.

Литература

1. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. — М.: Пищевая промышленность, 1979. — 120 с.
2. Голубев В.И. Пищевая биотехнология. — М.: ДеЛи принт, 2011. — 123 с.
3. Ле Ван Ньонг. Микробиологические и биохимические основы технологии вьетнамских традиционных ферментированных пищевых продуктов: дисс. докт. техн. наук. МТИПП. — М., 1981. — 336 с.
4. Польгаллина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов: справочник. — М.: ДеЛи принт, 2003. — 376 с.
5. Фомичева Г.М., Василенко О.В., Марфенина О.Е. Сравнительные морфологические, экологические и молекулярные исследования штаммов *Aspergillus versicolor* (VU111) Tiraboschi, выделенных из разных местобитаний // Микробиология. — 2006. — Т. 75. — № 2. — С. 228–234.
6. Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Koeck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study // *Lancet Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 11(9). — P. 671–676.
7. Dijkstra J., Forbes J.M., France J. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition. — Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 2005. — 736 p.
8. FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 52, 1973. — Rome: FAO, 1993.
9. Nagpal R., Puniya A.K., Sehgal J.P. and Singh K. Influence of bacteria and protozoa from the rumen of buffalo on in-vitro activities of anaerobic fungus *Caecomyces* sp. isolated from the feces of elephant // *Journal of Yeast and Fungal Research.* — 2010. — Vol. 1(8). — P. 152–156.
10. URL: www.gatesfoundation.org/topics/Pages/topics-overview.aspx (дата обращения 04.10.2011).
11. Vohra A., Kaur P., Satyanarayana T. Production, characteristics and applications of the cell-bound phytase of *Pichia anomala* // *Antonie van Leeuwenhoek.* — 2011. — Vol. 99(1). — P. 51–55.
12. Walker G.M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts // *Antonie van Leeuwenhoek.* — 2011. — Vol. 99(1). — P. 25–34.

Список сокращений:

ТФФ — твердофазная ферментация

PLANT-MICROBE NUTRIENTS. REPORT 1: SELECTION OF MICROBIAL BIOMASS PRODUCERS OF MILK BIOCENOSES

TRAN THI VAN, L.A. GULIMOVA, NGUYEN TRUONG GIANG, K.V. GORIN, E.G. BORISENKO

Moscow State University of Food Production, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Moscow

The work consists of three parts (reports). In this first part the possibility of isolation of yeasts and lactic acid bacteria of a universal food like milk of mammals and the use of these microorganisms in the solid state fermentation (SSF) of vegetable raw materials was investigated. The ability of these yeasts, especially the yeast *Pichia* kind of human breast milk rapidly accumulate biomass on solid non-hydrolyzed cellulosic substrates was revealed. Some of the patterns of interaction of yeasts and lactic acid bacteria in the SSF were shown.

Keywords: milk of mammals, yeast, bacteria, plant material, bioconversion, microbial nutrients.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОДЕСТРУКТОРОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ: ОБЗОР

В.А. ВИНОКУРОВ^{1*}, Р.Г. ВАСИЛОВ²

¹ *Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина,*

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

В обзоре рассматриваются современные подходы к биоремедиации загрязнений нефтепродуктами почвы и акваторий.
Ключевые слова: нефтяные загрязнения, биоремедиация, биодеструкторы.

Общие сведения о техногенных загрязнениях окружающей среды

Среди органических загрязнителей грунтов по токсичности и вредному воздействию на экосистемы на первом месте находятся хлорорганические пестициды, полициклические ароматические углеводороды и полихлорированные бифенилы. Причем, основными источниками двух последних загрязнителей являются нефть и нефтепродукты.

Вопросы, связанные с ликвидацией последствий аварийных разливов нефти, будут оставаться актуальными до тех пор, пока не истощатся ее природные запасы. Увеличение объемов добычи, транспортировки и переработки нефти в нашей стране увеличивает вероятность катастроф, приводящих к загрязнению почвы нефтью и нефтепродуктами. Следовательно, требуются новые эффективные методы удаления углеводородов нефти из почвы и восстановления ее плодородия.

При ликвидации разливов нефти на почву ведущими остаются механические и физико-химические методы очистки, позволяющие удалять основное количество загрязнения. Биологическим методам отводится лишь роль «доочистки», однако именно они позволяют снизить концентрации вредных веществ в почве до нормативных показателей, восстановить ее биоценоз, вернуть плодородие.

Таким образом, загрязнение окружающей среды в процессе добычи и транспортировки углеводородного сырья сегодня является объективным фактором и требует разработки эффективных мер по предотвращению такого загрязнения и ликвидации его последствий.

В мире ежедневно добывается более 85,1 млн. баррелей сырой нефти. Общие потери нефтяных углеводородов при добыче и транспортировке достаточно велики. По разным данным, по отрасли они оцениваются от 3 до 8–10% годовой добычи. В результате значительные территории суши и обширные морские и океанские акватории загрязняются нефтяными углеводородами.

В настоящее время добыча нефти в России составляет 511 млн. т в год. В последние годы резко выросла степень агрессивности перекачиваемых по трубопроводам водонефтяных эмульсий, пластовых и сточных вод. Это связано со вступлением большинства месторождений в более позднюю стадию разработки, с увеличением доли месторождений с повышенным содержанием сероводорода в нефти, а также в связи с массовым применением метода заводнения пластов. Отсюда — увеличение числа разливов нефти из-за внутренней коррозии трубопроводов.

Потери нефти в результате нарушения целостности магистральных и внутрипромысловых нефтепроводов достигают огромных величин и колеблются, по оценкам разных исследователей, в довольно широком диапазоне. На каждый кв. км в зоне месторождений и трасс нефтепроводов приходится до 0,02 т разлитой нефти в год. По данным Министерства природных ресурсов России и Российского отделения «Гринпис», потери нефти и нефтепродуктов за счет аварийных ситуаций ежегодно колеблются от 17 до 20 млн. т, что составляет около 4% объемов добываемой в стране нефти. Однако, несмотря на то, что, по данным Совета безопасности Российской Федерации, количество потерь составляет около 1,2%

© 2013 г. В.А. Винокуров, Р.Г. Василев

* **Автор для переписки:**

Винокуров Владимир Арнольдович

д.х.н., профессор

заведующий кафедрой физической и коллоидной химии

Российского государственного университета нефти и газа

им. И.М. Губкина

Тел.: +7 (499) 132-12-55

119991 Москва, Ленинский пр.-т., 65

добычи нефти, все равно речь может идти о 5–6 млн. т. Исследования, проведенные И.И. Мазуром, показывают, что потери нефти в результате аварийных проливов составляют около 3% от годовой добычи нефти, или примерно 9 млн. т в год. В еще большую величину оценивает потери нефти В.Ж. Арнс: они, по его мнению, достигают порядка 25 млн. т в год, хотя, по официальным источникам, они составляют всего 4,8 млн. т. С. Островский, ссылаясь на данные Международного социально-экологического союза, считает, что потери нефти составляют около 4,5 млн. т в год. По данным экспертов голландской независимой консалтинговой компании IWACO, в настоящее время в Западной Сибири нефтью загрязнено от 700 тыс. до 840 тыс. га земель. Это в 7 раз больше, чем территория Москвы. По мнению этих же экспертов, общая площадь загрязненных нефтью земель Самотлорского месторождения составляет 6500 га.

Ежегодно на нефтепромысловых трубопроводах происходит до 40–70 тыс. отказов, 90% которых являются следствием коррозионных повреждений, а на долю систем нефтесбора из общего числа аварий приходится 50–55%. Абсолютное большинство (89–96%) аварийных разливов нефти вызывает сильные и, как правило, необратимые нарушения природных биосистем и комплексов.

Следует отметить, что, кроме птиц и животных, погибающих в нефтяных озерах, от нефтяных разливов страдают люди. Концентрация нефтепродуктов на территории Нижневартовского района превышает российские допустимые нормы почти в 50 раз. В Нижневартовске 97% потребляемой питьевой воды загрязнено нефтепродуктами. Как показали исследования, даже на глубине 200 м обнаружена нефть. За последние 5 лет количество онкологических заболеваний в Нижневартовске, Лангепасе, Мегионе и Радужном возросло практически в 2 раза. Вследствие этого обостряется ситуация в социальной и гуманитарной сферах.

Очевидно, что на современном уровне развития нефтяной и нефтехимической промышленности не представляется возможным исключить ее воздействие на окружающую среду. Вероятность загрязнения почвенных экосистем остается высокой для большей части территории России. Таким образом, восстановление почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, является актуальной на сегодняшний день задачей. В связи с этим возникает необходимость разработки новых и совершенствования существующих технологий восстановления нефтезагрязненных и нарушенных земель. По этому вопросу существует большая литература, часть

которой проанализирована и обобщена в настоящем обзоре [1–11].

Биологические методы очистки почвы от нефти и нефтепродуктов

К данному классу методов относят сельскохозяйственную обработку почвы, применение биореакторов, биоремедиацию, фитомелиорацию и естественное разложение токсикантов в почве.

Под сельскохозяйственной обработкой почвы понимают перекапывание почвы с целью увеличения доступа кислорода воздуха к почвенным организмам и возрастания скорости естественной биодegradации. Почву разбрасывают по территории и периодически перекапывают для улучшения аэрации. Обрабатываемые участки обычно огораживают посадками для ограничения загрязненного стока. Степень восстановления почвы определяется ее типом, климатическими факторами (количеством осадков, температурой), уровнем и видом загрязнения, а также присутствующими микроорганизмами.

Биореакторы значительно различаются по своим рабочим характеристикам, но их принципиальное назначение заключается в стимулировании скорости биологической деградации посредством выбора оптимальной температуры, концентрации загрязняющих веществ, степени аэрации и других факторов. Опыт показывает, что действие почвенных микроорганизмов достаточно эффективно, и они способны адаптироваться к различным условиям окружающей среды.

В настоящее время биоремедиация является предметом научных исследований. Метод основан на стимулирующем действии аборигенных почвенных микроорганизмов за счет внесения в почву питательных, кислородосодержащих и/или других компонентов, которые обычно добавляют в почву путем распыления их водных растворов или же путем заправки. При использовании данного метода часто необходима экстракция добавленной жидкости, так как в нее могут попадать загрязняющие вещества.

Фитомелиорация — метод, основанный на посеве стойких к нефтяным загрязнениям и активизирующих почвенную микрофлору растений. Такие растения способствуют процессам разложения, стабилизации или устранения загрязняющих веществ из почвы. Данная технология применяется в основном на окончательной стадии рекультивации загрязненных почв. При этом органические загрязняющие вещества могут модифици-

роваться в области корневой системы растений, а также в черенках или листьях.

Естественное разложение — этот метод не является активной технологией восстановления почв; он основывается на самоочищающейся способности окружающей среды (обычно посредством активизации аборигенной микрофлоры). Главная задача ремедиатора — правильно оценить возможность использования этого метода на данной территории и проследить распространение загрязнения и очистку до завершения процесса.

Каждый из методов восстановления имеет ряд преимуществ и недостатков, которые и определяют возможность применения того или иного метода в рамках реализации *in situ* или *ex situ* технологии.

Результаты научно-исследовательских работ в этой области противоречивы и указывают на необходимость высоких капитальных и эксплуатационных затрат для решения ее задач. При обезвреживании загрязненных грунтов различными методами полностью выделить нефтепродукты не удается. Оставшаяся фаза после обработки содержит 3–5% нефтепродуктов, вследствие чего ее нельзя сбрасывать в отвал. Кроме того, для выделения нефтепродуктов часто требуется сложное дорогостоящее оборудование. Выделенные из почвы нефтепродукты зачастую не пригодны для повторного использования, так как в них высоко содержание механических примесей и окисленных веществ.

В сложившейся ситуации наиболее эффективным методом обезвреживания попавших в сточную воду и почву нефтепродуктов являются биотехнологии, которые основаны на окислении нефтепродуктов микроорганизмами, способными использовать нефтепродукты как источник энергии. Таким образом, осуществляется биологический круговорот: расщепление углеводов, загрязняющих почву, микроорганизмами, то есть их минерализация с последующей гумификацией. Каждая система биоокисления должна быть адаптирована к конкретным почвенно-климатическим условиям, в которых произошел разлив, что способствует восстановлению экологического равновесия.

Деструкция нефти под воздействием микроорганизмов

Среди естественных механизмов самоочищения почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами главная роль принадлежит микроорганизмам. Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут быть объектом микробиологического воздействия, претерпе-

вая разнообразные пути превращения. Углеводороды в почве разлагаются в результате деятельности углеводородоокисляющих микроорганизмов, способных окислять углеводороды до CO_2 и воды или превращать их в соединения, утилизируемые другими микроорганизмами. В этом процессе участвуют и грибы, и бактерии, причем значение последних в сообществе микроорганизмов-деструкторов наиболее значимо.

По степени снижения окисляемости микроорганизмами компоненты нефти и нефтепродуктов располагаются в такой последовательности: *n*-алканы > *i*-алканы > низкомолекулярные ароматические углеводороды > циклические алканы > смолы > асфальтены (почти не окисляются).

Наиболее активно утилизируются углеводороды с прямой цепью, *n*-парафины с длиной цепи C_{12} – C_{22} . В зависимости от условий они разлагаются на 10–90% в течение 1–2 месяцев при первоначальном суммарном содержании нефтяных углеводородов 0,5–2%. Большинство микроорганизмов не ассимилирует *n*-алканы, содержащиеся в цепочке менее 9 атомов углерода. Их окислять способны бактерии родов *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*. Низкомолекулярные *n*-алканы обычно угнетают развитие микробного сообщества, однако вследствие летучести их действие непродолжительно. *n*-алканы с длиной цепи более C_{20} при температуре окружающей среды представляют собой вязкие жидкости либо твердые вещества, поэтому транспорт их к клеткам затруднен. В смеси с *n*-алканами с меньшей длиной цепи они находятся в виде жидкости и потребляются относительно легко.

Более устойчивы к окислению изоалканы, циклоалканы и ароматические углеводороды. Многие из них в виде моносубстратов не потребляются микроорганизмами, они разлагаются в режиме соокисления с другими, более доступными углеводородами.

Биодеградация тяжелых фракций нефти, содержащих смолы и асфальтены, затруднена их устойчивостью к воздействию ферментов и малой способностью диспергироваться в жидкой среде. Они содержат большое число полиароматических соединений с конденсированными ядрами, из них относительно биодеградируемы только соединения с тремя и четырьмя ароматическими кольцами. Время полураспада этих соединений колеблется от 3 до 2000 недель. Для почвенной среды средние скорости минерализации тяжелых фракций нефти, ила и сырых остатков варьируют между 0,02–0,6 г углеводов на 1 кг почвы в сутки. В подпочвенных горизонтах скорость разложения даже наиболее доступных фракций нефти составляет 0,01–0,02 г/кг в сутки, то есть меньше, чем

на поверхности. За год в субтропиках биodeградируется $\approx 40\%$ нефти, оставшейся в почве после фотохимического разложения и испарения. В условиях холодного климата биodeградация нефти вследствие низкой активности естественных процессов может длиться десятки лет.

При благоприятных условиях основной процесс биодеструкции может протекать за 3–4 недели; при этом численность углеводородоксиляющих микроорганизмов увеличивается в 100–1000 раз, изменяется и численность других гетеротрофных микроорганизмов.

Заключительный и самый длительный этап в разложении нефти связан с трансформацией оставшихся высокомолекулярных соединений и образованием связанных остатков. Эта часть углеводородов устойчива к биологическому окислению. Чем более застарелое загрязнение, тем выше ее доля (от 1 до 20%). Таким образом, в совокупности физическая и химическая трансформация, биodeградация и образование связанных остатков приводят к устранению вредного действия нефти, попавшей в окружающую среду.

К наиболее важным факторам, от которых зависит скорость биodeградации, относится температура. Для биodeградации углеводородов оптимальна температура 30–40 °С, однако существуют микроорганизмы, способные окислять углеводороды как при более высоких, так и при более низких положительных температурах. Углеводороды с большой длиной цепи утилизируются при температуре не ниже 25 °С.

Оптимальное содержание влаги в почве для микроорганизмов-нефтедеструкторов — 50–80%. При меньшей влажности осмотические и матричные силы ограничивают доступность воды и, следовательно, лимитируют их рост. Однако в переувлажненных почвах снижение газового пространства затрудняет доступ кислорода. В почвах, загрязненных нефтью, водный баланс значительно нарушается из-за гидрофобности соединений нефти.

Окисление углеводородов микроорганизмами происходит в аэробных условиях. Углеводороды нефти — это полностью восстановленные соединения, и первым этапом их окисления является включение кислорода в их молекулу. Поэтому при окислении углеводородов кислород выполняет как функцию источника питания, так и функцию акцептора электронов в катаболических процессах.

После первичного окисления углеводородов разложение может продолжаться и в аэробных, и в анаэробных условиях. Денитрификаторы и сульфатредукторы, как правило, плохо окисляют исходные углеводороды, а содержание сульфатов и нитратов в природных средах незначительно; в связи с этим кислород часто лимитирует

деградацию углеводородов. Для поддержания аэробных условий при ремедиации почв, загрязненных нефтью, их периодически рыхлят. Денитрификация и сульфатредукция могут играть существенную роль на стадии разложения промежуточных продуктов окисления углеводородов — жирных кислот, фенолов, продуктов их расщепления — и в центральных зонах почвенных агрегатов.

На степень и скорость разложения углеводородов влияет агрегатное состояние, в котором они присутствуют в среде. Для водных сред важна растворимость углеводородов в воде, поскольку растворимые молекулы лучше транспортируются к клеткам микроорганизмов. Растворимость углеводородов низкая и уменьшается с увеличением их молекулярной массы. Насыщенный раствор тетрадекана (C₁₄), например, имеет концентрацию 1×10^{-6} мг/л. На скорость окисления влияет также степень дисперсности углеводородов в воде. Транспорт их в клетку происходит непосредственно при контакте эмульгированной углеводородной фазы с поверхностью клеток. Дисперсность можно повысить механическим воздействием или с помощью детергентов. Многие микроорганизмы способны продуцировать поверхностно активные вещества (ПАВ), эмульгирующие углеводороды и ускоряющие их окисление.

Адсорбция нефти и нефтепродуктов на поверхности почвенных частиц затрудняет их биодеструкцию вследствие образования крупных и плотных агломератов. В переувлажненной почве на почвенных частицах образуются рыхлые структурированные агрегаты, через поры которых увеличивается поступление кислорода и повышается скорость деградации углеводородов.

Для утилизации углеводородов нефти бактериями наиболее благоприятен нейтральный рН (от 6,5 до 8,0). Оптимальное развитие грибов и дрожжей происходит в кислой среде, в широком диапазоне рН развиваются смешанные популяции.

Минеральных компонентов в нефтяных загрязнениях содержится мало; кроме того, природные среды, особенно в северных регионах, обеднены источниками азота и фосфора. Как правило, при загрязнении нефтью дефицит биогенных элементов является лимитирующим фактором активности микроорганизмов-нефтедеструкторов. Известно, что для бактериального роста необходимо около 10 частей углерода на одну часть азота. Если это соотношение больше, то рост бактерий и утилизация источника углерода будут замедлены. К настоящему времени установлено, что для превращения 1 г углеводорода в клеточный материал требуется 150 мг азота и 30 мг фосфора. Для почв с застарелыми нефтяными

загрязнениями или при их повторном попадании характерно присутствие микроорганизмов-нефтедеструкторов («диких», или аборигенных). В этом случае для активизации углеводородокисляющей способности аборигенной микрофлоры достаточно провести агротехнические мероприятия. При ликвидации свежих нефтяных проливов в среду необходимо вносить препараты микроорганизмов-деструкторов. Сейчас на основе моно- и смешанных культур разработано и активно используется огромное число биопрепаратов, предназначенных для очистки природных и техногенных сред. В экстремальных условиях (в кислой среде, при дефиците влаги, ограничении в питательных веществах) как деструкторы нефти более эффективны дрожжи и грибы. Мицелиальный рост позволяет грибам распространяться между локальными источниками компонентов питания, проникать в почвенно-нефтяные агрегаты и в совокупности с устойчивостью к низкому содержанию влаги и низкому рН обеспечивает их активность на поздних стадиях разложения остатков нефти.

Очевидно, что продолжительность отдельных этапов очищения почв от нефти будет определяться целой группой факторов, влияющих на скорость разложения нефти и нефтепродуктов в почве: наличие адаптированных к нефтяным углеводородам углеводородокисляющих микроорганизмов, температура почвы, наличие кислорода в почве, влажность и кислотность почвы, состав и концентрация нефти. Почвы в естественном состоянии содержат углеводородокисляющие микроорганизмы в количестве менее 1% микробной популяции, в нефтезагрязненных грунтах их доля часто достигает 10%.

По сравнению с другими вредными веществами загрязнение углеводородами в большей степени влияет на макрофлору и макрофауну, на эстетическое восприятие окружающей среды и оказывает воздействие на микробную составляющую биоты. Микрофлора реагирует на изменения и способствует восстановлению окружающей среды, однако процесс может длиться довольно долго. Цель биоремедиации — ускорить его.

Биопрепараты на основе углеводородокисляющих микроорганизмов для восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами

Используя способность представителей микробных сообществ окислять углеводороды, создаются биопрепараты, которые применяются для рекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Способность использовать нефть в качестве источника углерода и энергии присуща не единичным

специализированным формам, а многим группам углеводородокисляющих микроорганизмов. В их числе бактерии из родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* (низшие грибы), *Fusarium*, *Trichoderma*, дрожжи — *Candida*, *Endomyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*. Есть исследователи, которые причисляют к этому ряду и другие микроорганизмы: *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Beijerinckia*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*.

Современный микробиологический метод рекультивации, основанный на применении высокоэффективных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из загрязненных природных объектов, широко используется в мировой практике рекультивационных мероприятий.

На сегодняшний день на российском рынке присутствуют биопрепараты, созданные на основе одного штамма бактерий или их консорциума, состоящего из нескольких штаммов для более эффективной работы препарата. Многие из существующих ныне биопрепаратов имеют в своем составе представителей класса грибоподобных организмов — дрожжей. Высшие грибы класса базидиомицеты не использовались до сих пор в технологиях рекультивации нефтезагрязненных почв. В литературе имеются некоторые сведения относительно способности этой группы организмов к деградации ароматических соединений. Данные о способности базидиальных грибов использовать углеводороды нефти в качестве источника углерода и энергии встречаются крайне редко.

В настоящее время производятся три основные формы биопрепаратов нефтеокисляющего действия:

- жидкая (несепарированная биомасса после ферментации с массовой долей влаги до 99% и титром 10^7 – 10^8 живых клеток/см³);
- пастообразная (сепарированная биомасса с массовой долей влаги до 30% и титром до 10^9 – 10^{10} живых клеток/см³);
- сухая (лиофилизированная или распылительно высушенная в токе теплого воздуха биомасса с влажностью от 3 до 5% и титром 10^9 – 10^{11} клеток в 1 г препарата).

Загрязнение воды нефтепродуктами

Ежегодно, по разным данным, в результате разливов нефти в акваторию попадает от 6 до 12 млн. тонн

нефти и нефтепродуктов. Исходя из статистики годовых объемов добычи нефти и объемов разливов нефти, можно с большой вероятностью спрогнозировать, что объемы нефтяных загрязнений акваторий будут возрастать.

Основным источником нефтяных разливов в акваториях являются суда, объем транспортировки нефти которыми составляет 1,5 млрд. т в год. Площадь перспективных для промышленного освоения участков морского дна около 70 млн. км², и хотя вклад морских нефтепромыслов в глобальное нефтяное загрязнение океана относительно мал — менее 2% от суммарного потока нефти в океан, надо учитывать и те потери, которые возникают в процессе транспортировки и хранения нефти.

Технологии обнаружения нефтяных разливов в акваториях позволяют быстро находить нефтяные разливы, определять их координаты, прогнозировать модели перемещения для последующей очистки акватории от нефтяного загрязнения.

Арктика играет важнейшую роль в глобальных экологических процессах. Несмотря на относительно малые размеры Северного Ледовитого океана (его площадь составляет 5% от площади Мирового океана, а объем вод 1,5% от объема вод Мирового океана) и прилегающих морей, они оказывают сильное влияние на состояние климата Земли и играют критическую роль во многих глобальных процессах.

Отдельные арктические моря и практически все шельфовые экосистемы Арктики отличаются высокой биологической продуктивностью (арктический шельф составляет более 25% от шельфа Мирового океана). Во всем Северном Ледовитом океане, в том числе и во льдах, интенсивно развивается флора и фауна.

При загрязнении акватории нефтью и нефтепродуктами происходит отравление и/или гибель большого количества организмов. При этом разрываются пищевые цепи, вследствие чего прерываются связи в экосистеме и разрушается ее живая составляющая. В результате уменьшается разнообразие живого мира.

Разработаны и применяются различные технологии для локализации нефтяного загрязнения и очистки (ликвидации) акватории от нефтяного загрязнения:

- для локализации нефтяного загрязнения используют физический и химический способы (ограждение, диспергирование, эмульгирование, сорбция, затопление, сжигание);
- для очистки (ликвидации) акватории от нефтяного загрязнения используют физический и биологический способы (сбор поверхности воды, биоремедиация, биоаугментация).

Заключение

Единой и стандартизированной методики оценки эффективности действия препаратов на основе микроорганизмов или биопрепаратов, применяемых для ремедиации почвенных экосистем, не существует в силу специфики области применения каждого препарата и особенностей как почвенного состава, так и углеводородного состава нефти.

Важнейшим фактором, разносторонне влияющим на активность процесса разрушения углеводородов в почве нефтеокисляющими микроорганизмами, являются почвенно- или водно-климатические условия. Эффективная деструкция различных углеводородов микроорганизмами, внесенными в почву (или воду) с препаратом, возможна лишь в тех случаях, когда они найдут в почве (или других средах, куда будут помещены) благоприятные условия для жизнедеятельности и развития (источники питания, необходимый тепловой и водный режимы и т.д.), то есть микроорганизму (или группе микроорганизмов) необходимо создать благоприятную экологическую нишу, в которой он будет развиваться.

Очень большое значение для жизнедеятельности нефтеокисляющих микроорганизмов имеет и качественный состав нефтяного сырья, попавшего в почву (или другую среду), и время, прошедшее с момента загрязнения. Различные фракции нефтепродуктов, их сочетания по-разному влияют на микроорганизмы, в том числе внесенные с биопрепаратами. Это вызвано возможностью использования различных углеводородов как источника энергии у данных микроорганизмов и определяется их физиолого-биохимическими особенностями, способностью разрушать тяжелые или легкие фракции углеводородного сырья.

В практике рекультивационных работ при очистке нефтезагрязненных земель использование биопрепаратов нефтеокисляющего действия занимает не последнее место. В настоящее время ведутся непрерывные дискуссии об их эффективности, целесообразности применения, возникают вопросы сравнительной эффективности в широком спектре предлагаемых разработок. Но, как показывает опыт, в той или иной степени эффективны практически все препараты. Вопрос в том, для каких разновидностей нефти, для каких условий они разрабатывались исходно и в каком диапазоне концентраций загрязнения они активны: иными словами, где более активны одни биопрепараты, а при каких условиях лучше работают другие.

Отсюда следует, что применение каждого биопрепарата, имеющего в своем составе активные формы

микроорганизмов, требует создания оригинальной технологии и строгого ее выполнения в процессе использования препарата. Для каждой почвенно-климатической зоны технология должна корректироваться. Так, главными факторами, накладывающими особенности на технологию в условиях Среднего Приобья, являются короткий период активных температур и химический состав разлитой нефти. При этом вполне возможно, что штаммы микроорганизмов, выделенные в зонах умеренного климата и активно разрушающие там углеводороды, в условиях Севера «работать» не будут из-за своих физиологических особенностей, адаптированных к более мягким климатическим условиям.

Наряду с технологическими вопросами, рассмотренными выше, существуют нерешенные задачи по созданию объективных и унифицированных аналитических методов количественной оценки эффективности биодеградации нефти в результате воздействия биодеструкторов. Наличие огромного числа углеводородных компонентов в составе нефти, в разной степени подверженных процессам биодеструкции, значительно усложняет решение проблемы.

Важнейшим, на наш взгляд, вопросом является создание нормативной базы, обеспечивающей единый подход к оценке эффективности использования биодеструкторов в Российской Федерации.

Литература

1. Башкин В.Н., Галиулин Р.В., Галиулина Р.А. Аварийные разливы нефти и газового конденсата вследствие несанкционированных врезок в трубопроводы: проблемы и пути их решения // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. — 2010. — № 10. — С. 3–6.
2. Винокуров В.А. Об использовании сертификации для содействия улучшению экологической ситуации в Москве // Партнеры и конкуренты. Лабораториум. — 2004. — № 11. — С. 6–7.
3. Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Башкин В.Н., Аكوпова Г.С., Листов Е.Л., Балакирев И.В. Сравнительная оценка разложения углеводородов газового конденсата и нефти в почве под действием биологических веществ // Агрехимия. — 2010. — № 10. — С. 52–58.
4. Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Бухгалтер Э.Б., Башкин В.Н., Сидорова И.Е., Грунвальд А.В., Семенцов А.Ю. Биологическая индикация ремедиации почвы, загрязненной газовым конденсатом // Агрехимия. — 2008. — № 10. — С. 69–73.
5. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 1996. — № 6. — С. 579–585.
6. Мазур И.И., Молдаванов О.И. Курс инженерной экологии. 2-е изд., испр. и доп. — М.: Высшая школа, 2001. — 510 с.
7. Плешакова Е.В. Эколого-функциональные аспекты микробной ремедиации нефтезагрязненных почв. Автореф. дисс. ... доктора биол. наук. — Саратов, 2010.
8. Силищев Н.Н. Микробиологические технологии в процессах ремедиации природных и техногенных объектов. Автореф. дисс. ... доктора биол. наук. — Уфа, 2009.
9. Сребняк Е.А., Ботвинко И.В., Малахова Д.В., Винокуров В.А. Способ получения биопрепарата для восстановления водоемов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Патент на изобретение РФ № 2327649 от 23.05.2006 г., бюл. 18 от 27.06.2008 г.
10. Сребняк Е.А., Винокуров В.А., Хомякова Д.В. Использование микробиологических методов для очистки морских акваторий от нефти и нефтепродуктов / Тезисы докладов Междунар. научной конф. «Инновации в науке и образовании — 2004». — Калининград, 2004. — С. 112.
11. Сребняк Е.А., Терехова В.А., Федосеева Е.В., Ботвинко И.В., Винокуров В.А. Биопрепарат «Морской снег» для восстановления акваторий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, и его экотоксикологическая оценка // Экология и промышленность России. — 2008, сентябрь. — С. 42–44.

USING BIODESTRUCTORS FOR CLEANING UP POLLUTED AREAS OF OIL AND PETROLEUM PRODUCTS: A REVIEW

V.A. VINOKUROV¹, R.G. VASILOV²

¹ I.M. Gubkin Russian State University of Oil and Gas,

² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

This review examines current approaches to bioremediation of oil pollution of soil and water areas.

Keywords: oil pollution, bioremediation, biodestructors.

МЕСТО ИММУНОГЕНЕТИКИ В БИМЕДИЦИНЕ

Р.М. ХАЙТОВ¹, Л.П. АЛЕКСЕЕВ^{1*}, Р.Г. ВАСИЛОВ²¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,² Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

В статье представлены данные об истории развития иммуногенетики человека, ее месте в современной биомедицинской науке и вкладе отечественных исследователей в ее развитие. Рассмотрены вопросы, связанные с ролью иммуногенетики в иммунологии в целом, а также функции генов иммунного ответа в физиологических процессах, напрямую не связанных с иммунитетом. Обсуждаются дальнейшие перспективы развития иммуногенетики.

Ключевые слова: иммуногенетика, биомедицина, история.

Одним из наиболее перспективных направлений биомедицинской науки является иммуногенетика. Уже сегодня ее достижения позволили реализоваться такому новому важнейшему клиническому направлению, как трансплантация органов и тканей. Помимо этого, благодаря достижениям отечественных иммуногенетиков, появились принципиально новые возможности в области вакцинопрофилактики и эпидемиологии инфекционных заболеваний; также были решены актуальные проблемы в области репродукции и установления иммуногенетической предрасположенности и устойчивости к целому ряду социально значимых заболеваний [6].

Основной предпосылкой для появления иммуногенетики стала невозможность решения проблемы клинической трансплантации органов и тканей. Дело в том, что уровень развития медицины уже во второй половине XIX — начале XX века технически позволял осуществлять пересадки органов и тканей. Однако, за исключением случаев, когда донором был близкий родственник и трансплантат в ряде случаев приживался, во всех других случаях он отторгался. В первую очередь, благодаря работам Грегора Менделя были установлены принципы наследования признаков (1866), хотя само название «ген» ввел датский ботаник В. Иогансен (1909). Объектами их исследований были растения. Тем не менее они стали основой для развития генетики

в целом, и сформулированные Г. Менделем принципы генетического наследования в дальнейшем легли в основу работ, выполненных на представителях животного мира, прежде всего, на мышах.

Проведение генетических исследований на мышах стало возможным благодаря созданию с помощью внутрисемейного скрещивания мышинных линий, внутри которых все животные являлись генетически идентичными. Линейные мыши каждой линии генетически отличаются не только от «диких» мышей, но и от мышей других линий. Одним из критериев внутрилинейной генетической идентичности служит толерантность к трансплантату (кожному лоскуту) от донора, принадлежащего к этой же линии [9, 11]. Используя этот факт, американский исследователь Дж. Снелл сформулировал основополагающие законы трансплантационного иммунитета и ввел понятие «главный комплекс тканевой совместимости» (МНС — от «major histocompatibility complex») [29]. В серии работ, выполненных совместно с П. Горером, была установлена экспрессия на клетках мышцы антигенов, ответственных за тканевую совместимость, которые с тех пор обозначаются как H-2 [10, 28]. В 1940-х годах Дж. Снелл подробно изучил данную систему антигенов.

Однако до использования этих знаний в клинической трансплантологии оставался еще значительный период времени. Дело в том, что методические приемы, использованные для изучения системы H-2 мышей [23, 25], являлись неприемлемыми (с этической и правовой точек зрения) для изучения МНС человека. Решению этой проблемы современная иммуногенетика и клиническая трансплантология обязаны французскому иммунологу Жану Доссе, который нашел путь к получению реагентов для выявления и идентификации антигенов

© 2013 г. Хайтов Р.М., Алексеев Л.П., Василлов Р.Г.

* Автор для переписки:

Алексеев Леонид Петрович
член-корреспондент РАМН, профессор, д.м.н.
заведующий лабораторией генетики гистосовместимости человека
ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России
115478 Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2

МНС человека [13, 20]. Основой его подхода стала следующая гипотеза: поскольку родители каждого ребенка, как правило, не идентичны по антигенам МНС, поэтому, согласно сформулированным законам наследования антигенов МНС, ребенок получает строго по половине генотипа каждого родителя и на поверхности его клеток должны экспрессироваться антигены обоих родителей. В результате в крови матери должны образовываться антитела против антигенов, входящих в МНС-генотип отца ребенка. Ж. Доссе считал, что в том случае, если его предположение верно, то эти антитела могут быть использованы в качестве «инструмента» для выявления МНС-антигенов человека, и антитела, полученные таким способом, могут быть использованы в дальнейшем для последующего определения набора МНС-генов конкретного человека [21].

Ж. Доссе использовал следующую модель исследования: он собрал значительное количество образцов сывороток от много рожавших женщин и перекрестно протестировал их с лейкоцитарной взвесью, полученной также от значительного количества мужчин. Ж. Доссе оказался прав — положительная реакция лейкоагглютинации с одним и тем же образцом лейкоцитарной взвеси была зарегистрирована при использовании нескольких образцов сывороток.

Таким образом, был открыт первый МНС антиген человека, названный «МАС». Опубликованная Ж. Доссе работа, содержащая описание этого открытия, вызвала живейший интерес исследователей, работающих в области гематологии, иммунологии и хирургии [22]. Однако стало ясно, что для практического использования в клинической медицине требуется продолжение исследований с целью получения спектра антител ко всем или большинству антигенов МНС человека [19], что позволило бы осуществлять МНС типирование.

Такая работа стала возможной благодаря созданию международного неправительственного сообщества исследователей, которые использовали схему, предложенную Ж. Доссе, и при этом обменивались образцами клеток и сывороток. На первом совместном совещании был выбран организационный комитет и принято решение координировать исследования путем создания четырехгодичных программ, завершающихся так называемыми Международными рабочими совещаниями и конференциями, подводящими итоги совместных исследований с постановкой задач для последующей программы. Следует отметить, что принятый на первом совещании алгоритм проведения исследований используется и в настоящее время.

Но если в работе первых программ принимали участие десятки исследователей, то сейчас в рамках четырехгодичных программ работают тысячи научных коллективов, объединяющих десятки тысяч исследователей. Исследование системы HLA, инициированное в 60-х годах XX века, с самого начала носило и носит по настоящее время характер «открытого» международного сотрудничества. Наиболее ярким доказательством этого является тот факт, что Ж. Доссе при вручении Нобелевской премии ему, Дж. Снеллу и Б. Бенасеррафу в 1980 году заявил, что международные исследования в области HLA являются беспрецедентным примером гуманитарного сотрудничества, исключающего патентование результатов [21].

На первом совещании было решено уточнить наименование МНС-человека и обозначить его как систему HLA от «human leukocyte antigens» [18].

Уже в 1970-х годах участниками международных исследований по HLA рассматривался вопрос о целесообразности изменения названия данной генетической системы с HLA на «систему генов иммунного ответа». Однако было решено оставить старое историческое название, подразумевая при этом, что в действительности речь идет именно о генах иммунного ответа и их продуктах — HLA антигенах.

Сегодня международное научное сообщество, изучающее гены иммунного ответа, объединяет десятки тысяч исследователей практически из всех государств. В Европе функционирует Европейская федерация иммуногенетиков (EFI), в США — Американское общество по гистосовместимости и иммуногенетике (ASHI), в Азии-Океании — Общество по изучению тканевой совместимости стран Азии и Океании (ASEATTA).

Использование в 1970–1980-х годах в рамках международных исследований типирования HLA-специфичностей, основанного на выявлении белковых молекул с помощью серологических и клеточно-опосредованных методов, дало возможность развиваться новой клинической дисциплине — трансплантологии органов и внести значительный вклад в целый ряд уже существовавших отраслей медицины. Одновременно с этим именно в данный период удалось сформулировать основные представления о роли белковых молекул HLA в развитии целого ряда физиологических и патологических процессов в организме человека. В основе широкого спектра биологических функций HLA антигенов лежит, в первую очередь, их участие в таких процессах, как межклеточное взаимодействие не только клеток иммунной системы, но и всех других ядродержащих клеток; распознавание

генетически чужеродных, в том числе, собственных перерожденных агентов, и их уничтожение; формирование и поддержание толерантности к клеткам собственного организма [16, 17].

Таким образом, уже в указанный период, когда не имелось технической возможности проводить исследования непосредственно генома человека, была достаточно полно изучена протеомика генов иммунного ответа человека и ее роль в физиологических и патологических процессах, протекающих в его организме [12, 27, 31].

Можно сказать, что иммуногенетика человека, по-видимому, является единственной отраслью биомедицины, где протеомика была изучена и уже нашла широкое применение в догеномный период. Подтверждением этому, в частности, служит следующий факт. В строении молекул HLA были обнаружены аминокислотные замены, приводящие к изменению их структуры, что, в свою очередь, ведет к изменению свойств данных молекул. И только в результате реализации программы «Геном человека» в 1990-х годах (окончание в 2000 году — первый вариант генома; полный геном — 2003 г.) стало ясно, что основой этих изменений являются единичные нуклеотидные замены, ведущие к появлению аллельных вариантов HLA генов, продукты которых, то есть, протеомы, были известны десятью годами ранее.

Первоначальной целью сообщества иммуногенетиков было решение проблемы селекции тканесовместимых пар донор-реципиент для нужд трансплантации органов и тканей. Однако достаточно скоро стало ясно, что биологическая роль генов HLA и их продуктов — антигенов HLA значительно шире и, по сути, они выполняют в организме целый ряд физиологических функций, в том числе, не связанных напрямую с иммунным ответом. Так, в частности, они обеспечивают физиологическое взаимодействие всех ядродержащих клеток организма человека, то есть обеспечивают само его существование. В основе этого взаимодействия лежит идентичность наборов — генотипов HLA антигенов, экспрессированных на взаимодействующих клетках одного организма [1].

Одновременно с этим HLA антигены обеспечивают распознавание и уничтожение всех агентов, несущих чужеродную генетическую информацию в виде чужеродных белковых продуктов. Это касается клеток, несущих чужеродные HLA антигены, включая собственные перерожденные, в том числе, раковые клетки.

Именно в «догеномный» период изучения HLA (1960—1985 гг.) были выполнены ключевые фундамен-

тальные исследования, посвященные биологической роли HLA антигенов. Так, благодаря работам Нобелевских лауреатов Р. Цинкернагеля и П. Догерти [32] был установлен феномен «двойного распознавания» чужеродных иммуногенных пептидов — основного этапа развития адаптивного иммунного ответа. Суть феномена заключается в том, что чужеродный иммуногенный пептид — инициатор иммунного ответа распознается T-клеточным рецептором, «запускающим» каскад иммунного ответа на данный пептид только в том случае, если он «представлен» T-клеточному рецептору собственной молекулой HLA (рис. 1).

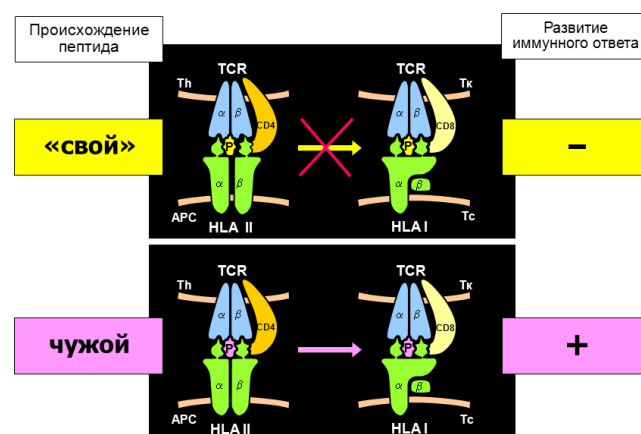


Рис. 1. HLA-молекулы и иммунный ответ (Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиология иммунной системы. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90. № 8. С. 124)

На рисунке 1 представлен этап распознавания пептида молекулами HLA класса II, а также эффекторный этап, обеспечиваемый HLA-молекулой класса I. Как следует из этого рисунка, ответ на иммунодоминантный пептид развивается только в том случае, если он представлен собственной HLA молекулой организма. Исключением является ситуация, когда пептид представляется чужеродными молекулами HLA, полностью идентичными собственным. Надо также отметить, что в том случае, если любой чужеродный иммуногенный пептид представляется T-клеточному рецептору чужеродной для данного организма HLA-молекулой, иммунный ответ будет развиваться не против этого пептида, а против чужеродной HLA-молекулы как наиболее сильного из известных на сегодняшний день иммуногенов.

В этот же период, благодаря циклу работ Памелы Бьеркман [14, 15], основанных на использовании метода кристаллографии, были установлены тонкие механизмы взаимодействия иммунодоминантного пептида и представляющей его молекулы HLA (рис. 2).

Эти исследования позволили установить принципы осуществления генетического контроля иммунного ответа, которые не подвергнуты пересмотру по настоящее время. Принципиально они состоят в следующем: для развития иммунного ответа на тот или иной иммунодоминантный пептид в антиген-связывающей области (бороздке) молекулы должны иметься специфичные для данного пептида участки связывания. Естественно, что биологически целесообразно наличие наибольшего количества пептид-связывающих участков (сайтов), взаимодействующих с различными иммунодоминантными пептидами. Последнее определяет уровень полиморфизма иммунного ответа.

В случае отсутствия в HLA-генотипе сайтов для взаимодействия с иммунодоминантным пептидом конкретного возбудителя иммунный ответ не развивается. Это относится как к развитию иммунного ответа на болезнетворный инфекционный агент, так и на вакцину, созданную для профилактики данного заболевания. Вероятность такой ситуации снижается за счет того, что развитие иммунного ответа зависит от наличия конкретных сайтов связывания иммунодоминантных пептидов в HLA генотипе, который, в свою очередь, состоит из двух HLA-гаплотипов. Один из них наследуется от отца, второй — от матери. В случае, если эти гаплотипы полностью различаются между собой, уровень разнообразия является максимальным, то есть обеспечивается возможность ответа на значительное количество патогенов или вакцин. В том случае, если наследуемые гаплотипы частично, а тем более, полностью совпадают (что вероятно при родственных браках), уменьшается количество распознаваемых патогенов или вакцин за счет того, что идентичные в двух гаплотипах сайты распознают одни и те же чужеродные агенты.

Таким образом, проблема иммуногенетической неответственности на конкретные возбудители инфекций или на вакцинацию представляется чрезвычайно актуальной для практического здравоохранения. Решение этой важнейшей для клинической медицины проблемы было найдено отечественными исследователями Р.В. Петровым и Р.М. Хаитовым, предложившими принципиально новый подход к преодолению такого рода иммуногенетической неответственности. Разработанный ими метод «Фенотипическая коррекция иммунного ответа» заложил основу для появления нового наиболее перспективного направления в вакцинологии [3, 4]. Авторы добились превращения фенотипически низкорезагирующих на данный антиген (инфекцию) особей в высокорезагирующие, модифицируя молекулу антигена иммуномодуляторами.

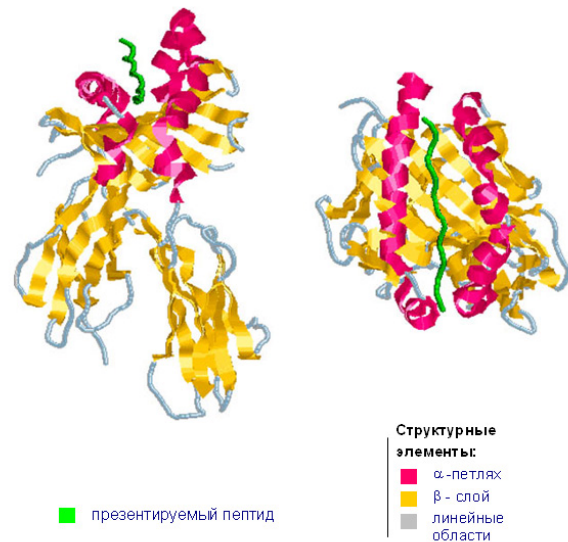


Рис. 2. Комплекс класс II HLA / презентуемый пептид

Основу такого превращения составляет «дополнительное вовлечение» в иммунный ответ новых сайтов генов, участвующих в развитии иммунного ответа на данный антиген. В результате этот подход открыл совершенно новые возможности создания вакцин нового поколения и в настоящее время позволил использовать достижения нанотехнологий в области направленной генетической «реконструкции» иммунного ответа. Примечательно, что именно этот подход является наиболее перспективным для мирового здравоохранения на пути создания эффективной вакцины против ВИЧ.

В природе существует ситуация, когда иммуногенетическое распознавание, не являясь основой для уничтожения в организме чужеродных болезнетворных агентов, представляется, тем не менее, необходимым физиологическим звеном обеспечения существования любого биологического вида [22]. Причем, этот процесс не направлен на уничтожение иммуногена. Речь идет о процессе репродукции. Дело в том, что для развития нормально протекающей беременности и появления здорового потомства с полноценной иммунной системой необходимым условием служит иммуногенетическая несовместимость родителей. Именно эта ситуация обеспечивает поддержание иммуногенетического разнообразия человека, поскольку наследование HLA генов осуществляется по кодоминантному типу, когда ребенок наследует строго по половине от каждого родителя. В случае наличия у родителей общих HLA антигенов (например, при родственных браках) может происходить снижение уровня полиморфизма (появление так называемых HLA гомозиготных генотипов), что ведет к

повышению вероятности возникновения неответственности на конкретные болезнетворные агенты.

В этот же период было выяснено, что HLA совместимость супругов значительно повышает вероятность развития целого ряда нарушений в области репродукции, таких как идиопатическое бесплодие, привычная невынашиваемость, тяжелые токсикозы беременности и др. Принципиальная возможность профилактики этих осложнений беременности была разработана уже в 1980-е годы. Однако результатом такого рода вмешательства является практически 100-процентная вероятность появления HLA-гомозиготного потомства, среди которого, как указывалось, повышена вероятность отсутствия иммунного ответа на целый ряд инфекционных агентов. Помимо этого, среди HLA гомозигот также повышена частота встречаемости онкологических и аутоиммунных заболеваний, что, естественно, связано с нарушением иммунного распознавания. В случае онкологических заболеваний речь идет о нарушении распознавания собственных измененных клеток [24]. В случае аутоиммунных заболеваний нарушается распознавание собственных неизмененных клеток за счет наличия в генотипе больных антигенов, общих с антигенами возбудителей ранее перенесенных заболеваний. Таким образом, для родителей с указанными репродуктивными проблемами, в генотипе которых имеются общие HLA антигены, существует выбор: отказ от общего ребенка или использование иммунотерапии, которая, возможно, позволит иметь ребенка с заведомо сниженной иммунологической защитой.

В 1970-х годах получило свое развитие еще одно направление иммуногенетики — «HLA и болезни». Было установлено, что с конкретными HLA антигенами ассоциирована предрасположенность или, напротив, устойчивость к конкретным заболеваниям. Наиболее выраженной оказалась ассоциация с аутоиммунными заболеваниями, в том числе, социально значимыми, такими как сахарный диабет 1 типа, системная красная волчанка и анкилозирующий спондилит. Также было показано, что такого рода ассоциации обнаруживаются и между HLA и определенными формами инфекционных и онкологических заболеваний [6, 7]. Одновременно с этим проведение масштабных международных исследований в области «HLA и болезни» стало основой для развития нового направления, получившего название «HLA и антропология». Его развитие связано со следующим: было найдено, что степень выраженности ассоциаций конкретных HLA-антигенов с заболеваниями весьма варьирует в зависимости от расовой и/или этнической принадлежности обследуемой группы и что

иммуногенетический профиль групп здорового населения, используемых в качестве контрольных, в значительной степени различается.

Эти данные послужили основанием для того, чтобы развернуть широкие международные сравнительные исследования по изучению особенностей HLA-полиморфизма в отдельных этнических группах, проживающих в различных регионах мира. Первые результаты этих обследований были обобщены на XI Международном рабочем совещании и конференции по изучению HLA (г. Иокогама, Япония, 1991). В работе форума приняли участие более 3000 ученых, представлявших свыше 2000 научных коллективов. Коллективу исследователей из Государственного научного центра — Института иммунологии (Москва) была вручена медаль за наибольший вклад в развитие направления «HLA и антропология». Это направление было приоритетным в программе форума.

Дальнейшее развитие указанного направления к сегодняшнему дню дало возможность наиболее полно установить генетическую взаимосвязь между отдельными популяциями и этническими группами, населяющими различные регионы мира. Использование для этих целей именно HLA полиморфизма определяется, в первую очередь, тем, что данная генетическая система является наиболее разнообразной (полиморфной) из числа генетических систем человека, что делает ее наиболее информативной при сопоставительном анализе различных рас и этнических групп населения [16]. Одновременно с этим открываются совершенно новые возможности международного обмена тканесовместимыми трансплантатами органов и тканей (в первую очередь, кроветворными стволовыми клетками — КСК). На рисунке 3 представлена дендрограмма, отражающая сходство и различие в распределении генов иммунного ответа в различных этнических группах населения, проживающих в разных регионах мира, включая Россию и ближнее зарубежье (последнее исследование выполнено сотрудниками Института иммунологии ФМБА России, Москва). На приведенной дендрограмме представлены результаты исследований по распределению HLA-DRB1 генов, несущих основную ответственность за распознавание чужеродных, в том числе, болезнетворных и собственных перерожденных агентов.

Примечательно, что XI Международное рабочее совещание стало первым всемирным научным форумом, на котором были представлены данные, полученные при проведении международных исследований не только с использованием протеомного, но и геномного анализа.

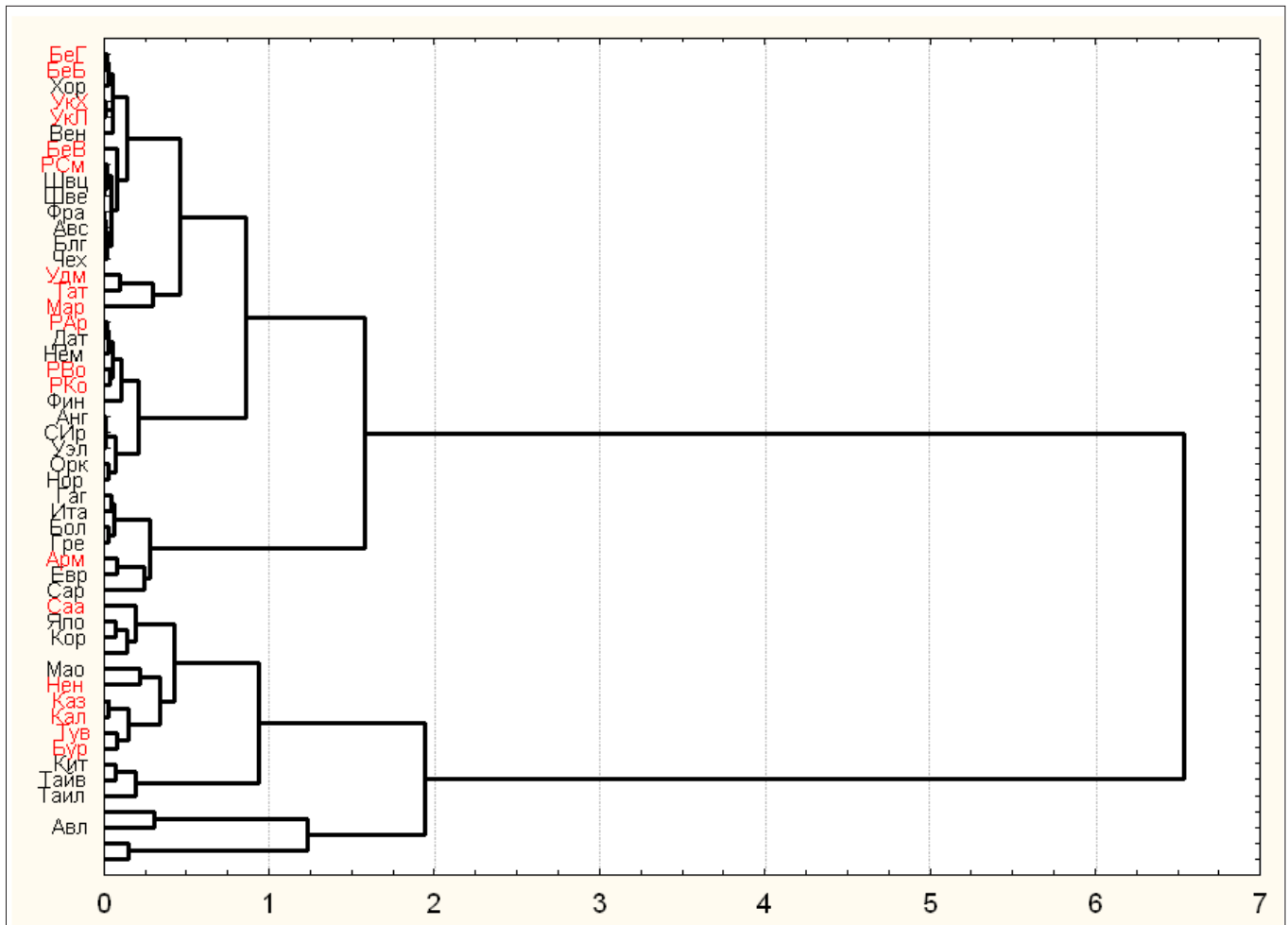


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний — распределение HLA-DRB1 генов (по оси ординат даны сокращенные наименования государств или регионов России)

В этой части научной программы также принимал активное участие коллектив исследователей Института иммунологии. Проведение анализа системы HLA на геномном уровне стало возможным благодаря тому, что в 1983 году Керри Мюллисом была открыта полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволившая проводить широкомасштабные молекулярно-генетические исследования. Переход с протеомных на молекулярно-генетические методы изучения системы HLA привел к прорыву практически во всех направлениях исследований иммуногенетики человека. Так, количество типизируемых HLA-специфичностей возросло к настоящему времени со 138 (белковых антигенов) до 8016 аллельных вариантов HLA генов, выявленных методом молекулярно-генетического анализа (по состоянию на июль 2012 г.). Указанные гены представлены на рисунке 4.

Они организованы в три основных класса. Класс I включает в себя гены A, B, C, E, F и G, обеспечивающие развитие эффекторного звена иммунитета и участвующие в репродуктивной функции. В области генов класса II

локализованы гены DR, DQ, DP, продукты которых обеспечивают иммунологическое распознавание чужеродных агентов (основная функция генов иммунного ответа). Помимо них, в области генов HLA класса II картированы так называемые «неклассические» гены LMP, TAP, DM, CLIP и др., ответственные за процессинг и презентацию иммунодоминантных пептидов, то есть, за выделение из антигена иммунодоминантного пептида и его «доставку» к соответствующим пептид-связывающим участкам молекулы HLA. В области генов HLA класса III локализованы гены C3, ответственные за функцию комплемента, а также гены TNF, кодирующие белки фактора некроза опухолей, HSP, кодирующие белки теплового шока и др. Эти гены объединены сходной функцией — обеспечением «неспецифической» защиты организма от чужеродных агентов без стадии распознавания генетически чужеродных агентов [6].

Вполне естественно, что молекулярно-генетического типирование нашло практическое применение в клинической трансплантологии. Дело в том, что еще до

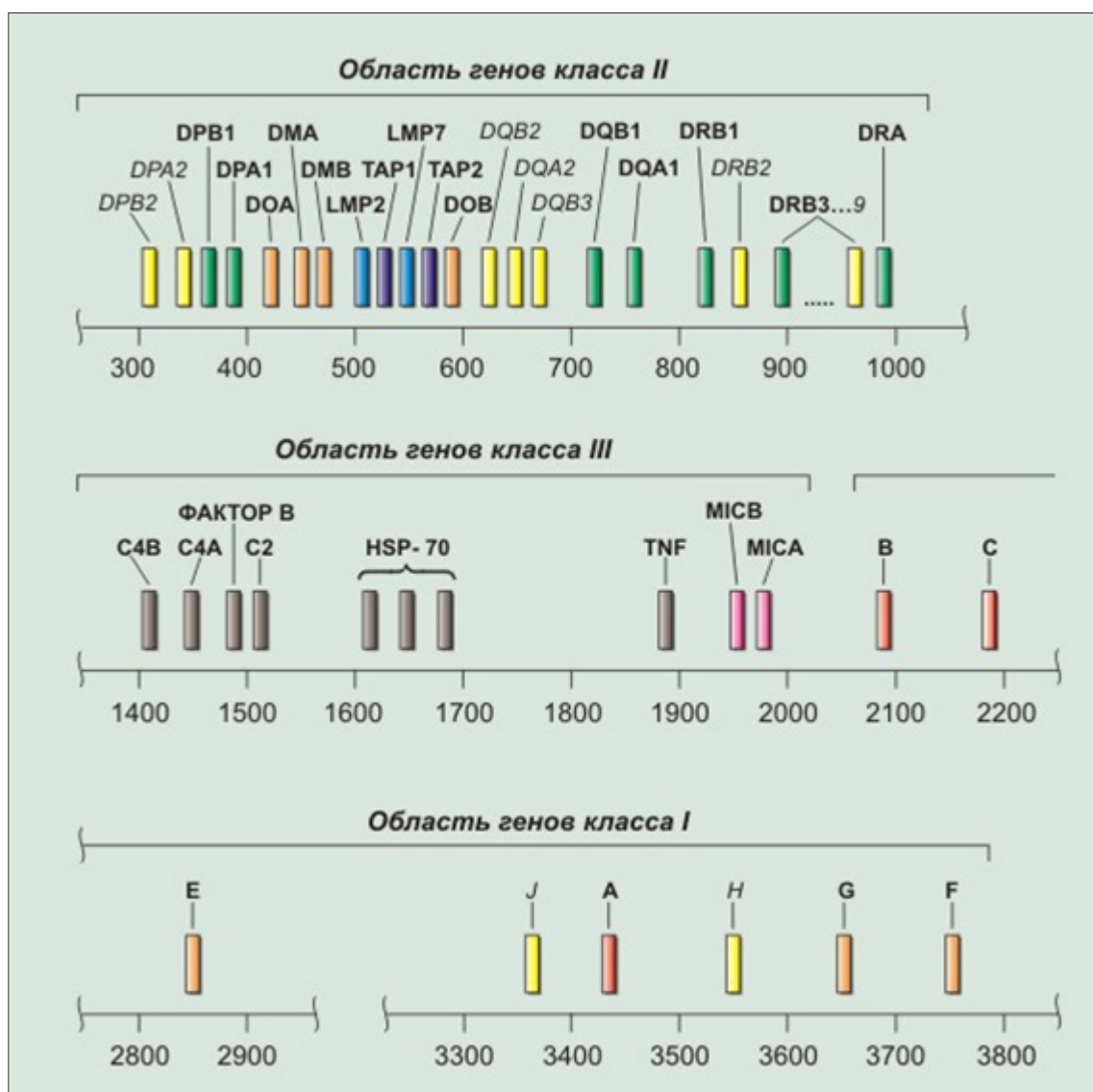


Рис. 4. Структура системы HLA генов

его создания (в 1970–1980 гг.) подбор тканесовместимых пар донор-реципиент, основанный исключительно на HLA-протеомном анализе, мог быть относительно эффективен только при пересадках органов [26, 30], но не кроветворных стволовых клеток. Однако в настоящее время использование молекулярно-генетических методов HLA-типирования не только сделало более эффективными органные трансплантации, но и позволило проводить эффективные пересадки КСК за счет того, что в 80% случаев удается подобрать тканесовместимые КСК, необходимые для пересадки больным онкогематологическими заболеваниями [2].

Подбор тканесовместимых пар для трансплантаций КСК требует значительно более высокого уровня тканевой совместимости по сравнению с органными пересадками. Это определяется, прежде всего, тем, что

сами трансплантируемые КСК являются, в отличие от органных трансплантатов, иммунокомпетентными клетками, которые в случае HLA-несовместимости сами развивают «иммунную атаку» на клетки организма больного. Под высоким уровнем подбора тканесовместимых КСК следует понимать HLA-генотипирование на уровне установления аллельных вариантов HLA-генов. Под аллельными вариантами генов HLA подразумеваются гены и их белковые продукты, имеющие незначительное отличие от исходного (дикого) варианта. Эти отличия могут касаться единичных нуклеотидных замен в геноме (SNP — от «single nucleotide polymorphism»), что соответственно ведет также к незначительным отличиям в аминокислотной последовательности, тем не менее, меняя протеомную структуру HLA-антигенов. Последнее, в свою очередь, может придавать такой молекуле HLA новые

биологические свойства, в том числе, сделать эту молекулу тканесовместимой с молекулой, кодируемой исходным геном. В основе формирования полиморфизма на уровне аллельных вариантов лежит мутационный процесс, но, в отличие от «обычных» мутаций, в ряде случаев SNP мутации закрепляются и приобретают распространенность в конкретной популяции в виде аллельного варианта того или иного гена. Аллельным вариантом гена (в отличие от обычной мутации) называются варианты того или иного гена, встречающегося с частотой выше 1% в популяции. Как правило, появление новых аллельных вариантов гена связано с их биологической целесообразностью в эволюционном процессе, в том числе, с преимуществами выживания носителей этих вариантов гена. Этот механизм лежит в основе возникновения чрезвычайно высокого уровня полиморфизма генов HLA, основанном на SNP.

Полиморфизм HLA служит основой иммуногенетической защиты человека от чужеродных агентов. По существу, именно он, в первую очередь, определяет и поддерживает биологическую индивидуальность человека. Поэтому для решения проблемы подбора тканесовместимого донора КСК необходим подбор, приближающийся к полностью совместимым (на уровне аллельных вариантов) парам донор-реципиент. Следует учитывать, что вероятность нахождения такого уровня совместимости среди неродственных пар колеблется от 1 на 1000000 до 1 на 3000000 для представителей различных этнических групп.

Кажущаяся неразрешимой проблема поиска доноров КСК для клинической трансплантации в настоящее время решена за счет создания Всемирной Ассоциации Доноров Костного Мозга (ВАДКМ) – по-английски «World Marrow Donor Association» (WMDA). Теперь поиск тканесовместимых доноров и реципиентов стал рутинной процедурой, поскольку ВАДКМ располагает регистром HLA-генотипированных доноров-добровольцев, готовых предоставить безвозмездно трансплантат КСК любому больному, проживающему в любой стране мира, регистр которой входит в регистр ВАДКМ и следует его стандартам. К сожалению, Россия не может принимать полноценного участия в этом процессе, прежде всего, в связи с нерешенностью организационных и правовых аспектов проблемы трансплантации КСК в России. При этом медико-биологическая составляющая (включая молекулярно-генетическое генотипирование на соответствующем уровне) проблемы трансплантации КСК в России решена [8].

Необходимым условием для решения проблемы трансплантации КСК в нашей стране является между-

народное сотрудничество. Это обусловлено чрезвычайно высоким уровнем генетического разнообразия генов HLA, при котором поиск тканесовместимого донора среди неродственных доноров-добровольцев требует наличия регистра, включающего в себя миллионы потенциальных генотипированных доноров. Что касается родственных доноров, то пары родители-дети практически всегда несовместимы. Сибсы (братья-сестры) совместимы лишь в 25% случаев. Эффективный централизованный международный обмен КСК стал возможен лишь при создании ВАДКМ, объединяющей к настоящему времени более 17 миллионов доноров-добровольцев КСК, готовых безвозмездно предоставить КСК неизвестным им больным из разных частей света. В соответствии с решениями ООН, ЮНЕСКО и ВОЗ, безвозмездность донорства, в том числе КСК, служит необходимым условием, нарушение которого в ряде стран законодательно приравнивается к торговле людьми [5].

Как уже указывалось, по уровню своего генетического разнообразия система HLA наиболее полиморфна среди генетических систем всех биологических видов, населяющих Землю, включая человека. Существует достаточно обоснованное мнение, что как раз это обстоятельство обеспечило наибольшую выживаемость человека как вида и наиболее ярко это демонстрирует многовековая история борьбы человека с инфекциями. Дело в том, что именно иммунная система должна распознавать любые, в том числе, новые болезнетворные агенты и обеспечивать формирование адекватного ответа на них. Это было установлено благодаря протеомным и молекулярно-генетическим исследованиям двух последних десятилетий, когда стало ясным, что иммунная функция HLA генов и их продуктов отнюдь не ограничивается обеспечением представления иммунодоминантных пептидов Т-клеточным рецепторам и запуском иммунного ответа на эти пептиды. В действительности, именно так называемые «неклассические» молекулы HLA обеспечивают все этапы «выделения» иммунодоминантных пептидов из чужеродных молекул и клеток (включая бактериальные) и их доставку антиген-представляющим структурам молекул HLA, которые лишь после связывания пептидов с соответствующими сайтами могут экспрессироваться на поверхности клеток и полноценно участвовать в иммунном ответе (рис. 5).

Как следует из рисунка 5, к этим генам, контролирующим функции, называемые процессингом и презентацией иммунодоминантных пептидов, относятся HLA-TAP и HLA-LMP, ответственные за функцию молекул HLA класса I, и HLA-CLIP и HLA-DM,

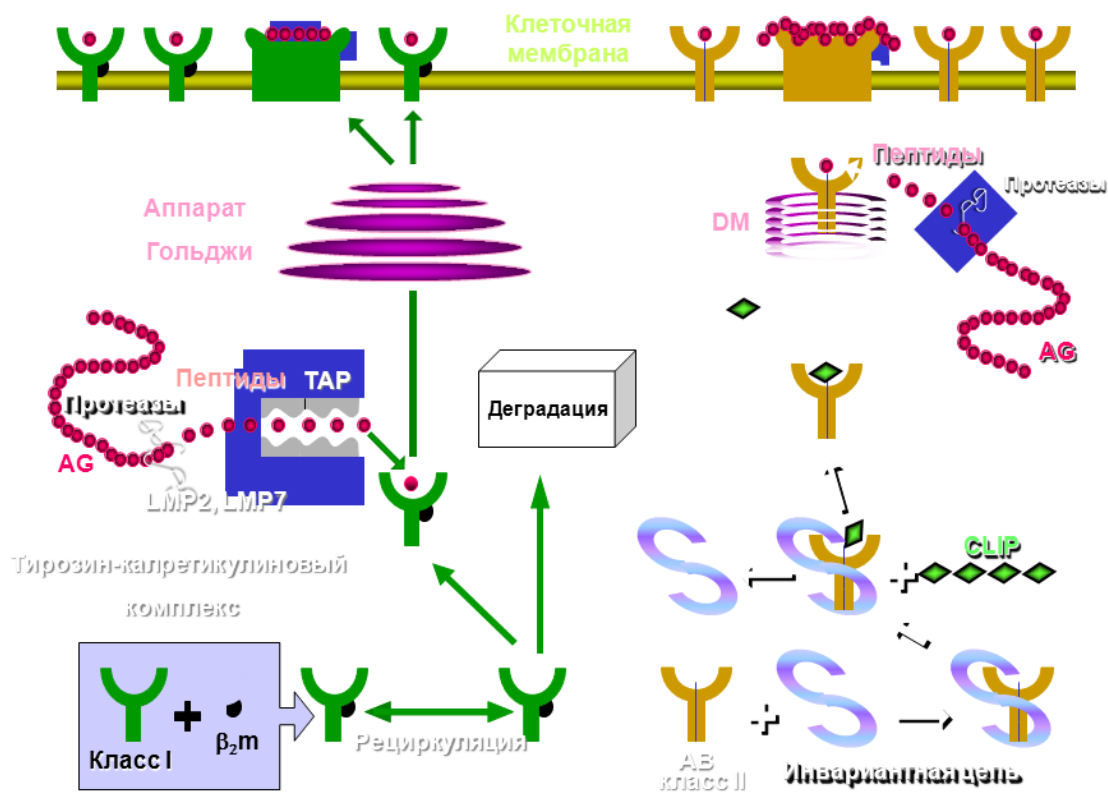


Рис. 5. Процессинг и экспрессия комплекса HLA+пептид

ответственные за функцию молекул HLA класса II. Также надо отметить, что нарушение функции этих генов и их продуктов ведет к развитию тяжелых форм иммунологической недостаточности, включая инфекционные, онкологические и аутоиммунные заболевания.

Таким образом, система HLA обеспечивает и контролирует почти все этапы развития иммунного ответа человека. «Недостающим» звеном в этой ее функции является передача сигналов запуска иммунного ответа от этапа его инициации, реализуемой с помощью молекул HLA класса II, к эффекторному этапу, осуществляемому Т-клетками-эффекторами и Т-хелперами. Что касается этого «недостающего» звена, то его иммуногенетический контроль осуществляет группа генов, контролирующих иммуноцитокينات, которые, по современной номенклатуре, относят к «не-HLA-генам иммунного ответа».

Естественно, что отдельно взятый организм не в состоянии обладать столь высоким уровнем генетического разнообразия, который мог бы обеспечить присутствие в антиген-распознающей бороздке сайтов для любого вновь появившегося болезнетворного агента. Однако такая задача решается на популяционном уровне, где структура распознающих сайтов отличается крайне выраженным разнообразием. Более того, одним из важнейших

достижений биомедицинской науки, явившимся результатом реализации программы «Геном человека», стало формирование представлений о роли генетического полиморфизма на уровне одиночных SNP. Наиболее ярким примером SNP служит именно система HLA, которая, как указывалось, является наиболее полиморфной системой человека, включающей в себя более 7000 аллельных вариантов генов, «закрепившихся» в геноме в силу той или иной биологической целесообразности. Очень важно, что значительная часть SNP вариантов одного и того же гена выполняет отличные или даже противоположные от основного (дикого) гена функции. По существу процесс формирования полиморфизма на уровне одиночных нуклеотидных замен в системе HLA представляет собой наиболее яркое проявление позитивной биологической роли мутационного процесса, в результате которого возникают и закрепляются новые аллельные варианты генов иммунного ответа. Это обеспечивает выживание человека как вида в условиях агрессивной окружающей среды, что подтверждают данные о формировании современных HLA профилей населения различных регионов мира [17]. Так, наиболее часто встречающимся среди коренного населения Европы является гаплотип HLA-A1-B8-DR3. Частота встречаемости этого гаплотипа значительно пре-

вышает таковую не только у представителей других рас, но и статистически ожидаемую; поэтому этот гаплотип считается классическим иммуногенетическим маркером европеоидов. Уже в 1970-х годах выдающийся иммуногенетик Вальтер Бодмер выдвинул гипотезу, согласно которой это превышение связано с тем, что у носителей этого гаплотипа имелось селективное преимущество в выживании в условиях античных и средневековых пандемий. Эта точка зрения была поддержана основателем иммуногенетики — Жаном Доссе. В 1980-х годах сотрудниками Института иммунологии (Москва) была проведена серия работ, в которой было установлено, что наличие данного гаплотипа и входящих в него антигенов ассоциировано с показателями иммунитета, которые в настоящее время отнесены к основным эффекторам врожденного иммунитета (активность естественных клеток-киллеров, фагоцитоз и др.) [6].

Примечательно, что врожденный иммунитет обеспечивает защиту организма от болезнетворных вирусов, бактерий и злокачественно перерожденных клеток. Встреча коренного населения Америки с европейцами во время освоения континента закончилось для аборигенов трагически, поскольку встречаемость указанных HLA гаплотипов и соответственно уровень врожденного иммунитета у них был и остается чрезвычайно низким и не обеспечил эффективной защиты против привезенных инфекционных агентов.

Следует отметить, что относящееся к европеоидной расе население Земли «расплачивается» по настоящее время за высокий уровень частоты встречаемости гаплотипа HLA-A1-B8-DR3, который ассоциирован с предрасположенностью к заболеваниям аутоиммунного генеза, включая сахарный диабет 1 типа и ряд других эндокринологических патологий, а также системную красную волчанку, анкилозирующий спондилит, миастению гравис (*myasthenia gravis*) и др.

Представляет интерес то, что в большинстве стран мира с населением, принадлежащим к монголоидной расе (ориенты), аутоиммунные патологии составляют малый процент в структуре заболеваемости. Практически единственным исключением является популяция узбеков, занимающая первое место в мире по числу случаев сахарного диабета 1 типа среди представителей ориентов. Только в данной этнической группе ориентов частота встречаемости гаплотипа HLA-A1-B8-DR3 приближается к таковой у европеоидов.

Приведенные примеры основаны на историческом опыте человечества, однако подобные механизмы могут играть роль и в настоящее время. Это относится,

в частности, к «чуме» XX и XXI веков — СПИДу. Дело в том, что вирус СПИДа поражает клетки иммунной системы, несущие рецептор CD4+ (характерный для субпопуляции иммунокомпетентных клеток — Т-хелперов, принимающих непосредственное участие в инициации и контроле иммунного ответа). Рецепторы CD4+ являются основными «воротами», через которые вирус ВИЧ попадает в иммунную систему человека. Но в число обязательных участников этого процесса входит еще один рецептор, контролируемый генами иммунного ответа, не относящимися к HLA. Среди аллельных вариантов, возникших в результате мутационного процесса этого рецептора, названного CCR5 и относящегося к хемокинам, в данном гене имеется вариант CCR5delta32. Этот вариант рецептора, в отличие от основного (дикого гена), обладает важной особенностью, а именно: он не связывается с ВИЧ и тем самым блокирует его проникновение в клетку, предохраняя организм от развития заболевания. Правда, следует принять во внимание, что этот процесс имеет место только в случае, если рассматриваемый рецептор представляет собой продукт гомозиготного варианта CCR5delta32. В случае его присутствия в гетерозиготной форме, то есть только на одной хромосоме, заболевание может развиваться, хотя и протекает в менее агрессивной форме. Сотрудниками ФГБУ «ГНЦ — Институт иммунологии» ФМБА России было проведено изучение частоты встречаемости на массиве около 1000 «здоровых» человек, относящихся к 10 этническим группам, принадлежащим 2 расам: европеоиды и ориенты — и проживающим на территории России и бывших республик СССР (рис. 6).

Из данных, представленных на рисунке 6, следует, что наиболее высокая частота встречаемости CCR5 delta32 гомозигот выявлена на Северо-Западе Европейской части России и снижается по направлению к Киргизии и Туве.

Таким образом, эти данные подтверждают представления о возможной роли агрессивных факторов окружающей среды в формировании межпопуляционных различий в иммуногеноме человека. При этом надо принять во внимание, что к настоящему времени эти представления подтверждаются не только на уровне воздействия инфекционных агентов, но и таких неблагоприятных для человека факторов, как радиация [1].

В заключение отметим, что система генов иммунного ответа сама по себе стоит на страже своего разнообразия, не допуская появления гомозигот по указанным генам иммунного ответа. Этим обеспечивается



Рис. 6. Географическое распределение аллеля CCR5delta32 (анализ 10 этнических групп России и стран СНГ)

биологическое преимущество гетерозигот, имеющих, в частности, значительно меньший шанс по сравнению с гомозиготами в развитии практически всех социально значимых заболеваний человека.

Литература

1. Пальцев М.А., Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Иммуногенетика человека и биобезопасность. — М.: Медицина, 2007. — 143 с.
2. Пальцев М.А., Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Болдырева М.Н. Главный комплекс тканевой совместимости человека (HLA) и клиническая трансплантология // Молекулярная медицина. — 2009. — № 2. — С. 3–13.
3. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. Иммуногенетика и искусственные антигены. — М.: Медицина, 1983.
4. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Норимов А.Ш. Фенотипическая коррекция Ig-генного контроля иммунного ответа при иммунизации конъюгатами (Т,Г)-А-Л с синтетическими полимэлектролитами // Иммунология. — 1985. — № 2. — С. 21–24.
5. Совет Европы Конвенция / «О защите прав человека и человеческого достоинства в связи с применением биологии и медицины» (О правах человека и биомедицине) / Страсбург, ноябрь 1996 г. Dir/Jur (96).
6. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. — ВИНТИ РАН, 2005. — 375 с.
7. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиология генов иммунного ответа // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2003. — Т. 89. — № 3. — С. 313–328.
8. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Хаманева Н.Ю., Алексеева П.Л., Болдырева М.Н. Проблема трансплантации неродственных кроветворных стволовых клеток человека и биобезопасность // Молекулярная медицина. — 2010. — № 5. — С. 3–9.
9. Amos D.B. The agglutination of mouse leukocytes by iso-immune sera // Br. J. Exp. Path. — 1953. — Vol. 3. — P. 464–470.
10. Amos D.B., Gorer P.A., Mikulska B.M. An analysis of an antigenic system in the mouse (The H-2 system) // Proc. Royal Society B. — 1955. — Vol. 144. — No. 916. — P. 369–380.
11. Amos D.B., Gorer P.A., Mikulska B.M., Billingham R.E., Sparrom E.M. An antibody response to skin homografts in mice // Br. J. Exp. Path. — 1954. — Vol. 35. — P. 203–208.

12. *Bach F., Amos D.B.* Phenotypic expressions of the major histocompatibility locus in man (HLA): Leukocyte antigens and mixed leukocyte culture reactivity // *J. Exp. Med.* – 1968. – Vol. 128. – P. 623–639.
13. *Bach F., Hirschhorn K.* Lymphocyte interaction: a parental histocompatibility test in vitro // *Science.* – 1964. – Vol. 143. – P. 813–814.
14. *Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B. et al.* The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens // *Nature.* – 1987. – Vol. 329. – P. 512–518.
15. *Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., and Willey D.C.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2 // *Nature.* – 1987. – Vol. 329. – P. 506–512.
16. *Bodmer W.* HLA Polymorphism: Origin and Maintenance / In: *HLA 1997.* P. Terasaki and D. Gjertson. – 1998. – P. 1–7.
17. *Bodmer W., Bodmer J.G.* Evolution and function of the HLA system // *Brit. Med. Bull.* – 1978. – Vol. 3. – P. 309–316.
18. *Bodmer W.F.* Evolutionary significance of the HL-A system // *Nature.* – 1972. – Vol. 237. – P. 139–145.
19. *Brodsky F.M., Parham P., Barnstable C.J., Crumpton M.J., Bodmer W.F.* Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system // *Immunol. Rev.* – 1979. – Vol. 47. – P. 3–61.
20. *Dausset J.* Iso-leuco-anticorps // *Acta Haematologica.* – 1959. – Vol. 20. – P. 156–166.
21. *Dausset J.* The major histocompatibility complex in man: past, present, and future concepts // *Science.* – 1981. – Vol. 213. – P. 1469–1474 (Nobel Lecture).
22. *Dausset J., Contu L.* Is the MHC a general self-recognition system playing a major unifying role in an organism? // *Human Immunol.* – 1980. – Vol. 1. – P. 5–17.
23. *Gorer P.A., Lyman S., Snell G.D.* Studies on the genetic and antigenic basis of tumour transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and «fused» in mice // *Proceedings of the Royal Society of London – Series B: Biological Sciences.* – 1948. – Vol. 135. – P. 499–505.
24. *Haldane J.B.S.* The genetics of cancer // *Nature.* – 1933. – Vol. 132. – P. 265–267.
25. *Klein J.* The major histocompatibility complex of the mouse // *Science.* – 1979. – Vol. 203. – P. 516–521.
26. *Patel R., Mickey M.R., Terasaki P.I.* Serotyping for homotransplantation of kidneys from unrelated donors // *New Eng. J. Med.* – 1968. – Vol. 279. – P. 501–506.
27. *Robinson M.A., Noreen H.J., Amos D.B., Yunis E.J.* Target antigens of cell-mediated lympholysis discrimination of HLA subtypes by cytotoxic lymphocytes // *J. Immunol.* – 1978. – Vol. 121(4). – P. 1486–1490.
28. *Snell G.D.* Histocompatibility genes of the mouse. I. Demonstration of weak histocompatibility differences by immunization and controlled tumor dosage // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1958. – Vol. 20. – P. 787–824.
29. *Snell G.D.* Methods for the study of histocompatibility genes // *J. Genet.* – 1948. – Vol. 49. – P. 87–108.
30. *Stickel D.L., Amos D.B., Robinson R.R., Glenn J.F., Zmijewski C.M., Metzgar R.S., Hayes C.P.* Renal transplantation with donor recipient tissue-matching: Preliminary report of first case in North Carolina // *N.C. Med. J.* – 1965. – Vol. 26. – P. 379–383.
31. *Van Rood J.J., Eernisse J.O., Van Leeuwen A.* Leucocyte antibodies in sera from pregnant women // *Nature.* – 1958. – Vol. 181. – P. 1735–1736.
32. *Zinkernagel R.M. & Doherty P.C.* Restriction of in-vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system // *Nature.* – 1974. – Vol. 248. – P. 701–702.

IMMUNOGENETICS PLACE IN BIOMEDICINE

R.M. KHAITOV¹, L.P. ALEXEEV¹, R.G. VASILOV²

¹ *Institute of Immunology FMBA Russia,*

² *Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow*

The article presents data on the history of human immunogenetics, its place in the modern biomedical science and the contribution of Russian researchers in its development. The problems associated with the role of immunogenetics in immunology in general, as well as the functions of immune response genes in physiological processes that are not directly related to immunity were analyzed. We discuss the prospects of development of immunogenetics.

Keywords: immunogenetics, biomedicine, history.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2013 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1883 — открыт фагоцитоз И.И. Мечниковым.

1883 — Вильгельм Ру высказал предположение о линейном расположении в хромосомах наследственных факторов: хроматиновых зерен («ид» — по Вейсману).

1883 — Август Вейсман сформулировал теорию непрерывности зародышевой плазмы.

1888 — В. Вальдейер предложил термин «хромосома».

1893 — открытие нитрифицирующих бактерий (С.Н. Виноградский).

1908 — Арчибалд Гаррод (Великобритания) впервые выдвинул предположение о связи между генами и ферментами (в 1941 г. это показали Бидл и Тейтем: один ген — один фермент!).

1913 — выход в свет книги Уильяма Бэтсона «Проблемы генетики» (англ. яз.).

1913 — А. Стертевант (будучи студентом) в лаборатории Т. Моргана впервые построил карту расположения генов (установил порядок генов в X-хромосоме).

1913 — усовершенствование Каррелем метода культуры клеток.

1923 — присуждение Нобелевской премии Ф.Г. Бантингу, Дж. Маклеоду за открытие инсулина.

1923 — открытие Бриджесом транслокаций у дрозофилы.

1928 — публикация статьи Н.К. Кольцова о принципе самоудвоения наследственной молекулы в немецком журнале «Biologisches Zentralblatt».

1928 — английский микробиолог Ф. Гриффит (1877–1941) установил, что непатогенный штамм пневмококка может трансформироваться в патогенный

с помощью трансформирующего фактора (О.Т. Эйвери в 1944 году показал, что это — ДНК).

1928 — открытие А. Флемингом пенициллина.

1933 — получение Т.Х. Морганом Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие функций хромосом как носителей наследственности.

1933 — использование электрофореза для разделения белков в растворе (Тизелиус).

1938 — появление термина «молекулярная биология». Авторство традиционно приписывают американскому математику Уоррену Виверу (Warren Weaver, 1894–1978).

1943 — С. Лурия и М. Дельбрюк показали, что бактерии содержат спонтанно мутирующие гены (их эксперимент получил название «флуктуационный тест»). Публикация: Luria S. and Delbrueck M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics. — 1943. — Vol. 28. — P. 491–511.

1953 — 60 лет публикации в «Nature» статьи Дж. Уотсона и Ф. Крика о структуре ДНК.

1953 — вручение Нобелевской премии Хансу Кребсу за открытие цикла лимонной кислоты (совместно с Ф. Липманом).

1958 — получение Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж.У. Бидлом и Э.Л. Тейтемом за открытия, касающиеся роли генов в специфических биохимических процессах» (половинная премия). Другая половина премии была присуждена Дж. Ледербергу за открытия, касающиеся генетической рекомбинации у бактерий и структуры их генетического аппарата.

1968 — присуждение Нобелевской премии за расшифровку генетического кода М. Ниренбергу, Х.Г. Коране, Р. Холли.

1973 — С. Коэн и Г. Бойер — первый рекомбинантный организм.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

1973 — первая беременность после оплодотворения в пробирке.

1978 — компания Генентех объявила об успешном лабораторном синтезе человеческого инсулина с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

1983 — присуждение Нобелевской премии Барбаре МакКлинток (1902–1992) за открытие транспозирующих (мобильных) генетических систем. Причем, эти данные были получены в ее классических экспериментах на кукурузе более трех десятилетий назад.

1983 — 30-летие открытия полимеразной цепной реакции (ПЦР) К. Мюллисом (фирма «Cetus»), который за это был удостоен Нобелевской премии (1993).

1983 — выделение вируса СПИДа в нескольких лабораториях США и Европы.

1983 — создание метода конструкции фрагментов ДНК длиной от 5 до 75 пар оснований (М. Сарруthers, Колорадский университет). Затем была разработана автоматическая установка (совместно с L. Hood из Калифорнийского технологического института).

1983 — основание Научно-образовательного центра в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина АН СССР (ныне — Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

1988 — основан Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information — NCBI), являющийся частью Национальной медицинской библиотеки США и отделом Национальных институтов здоровья (расположен в Бетесде, штат Мериленд).

1993 — создана Ассоциация биотехнологической промышленности («The Biotechnology Industry Organization»).

1993 — 20 лет присуждения Нобелевской премии по физиологии и медицине Р. Дж. Робертсу и Ф.А. Шарпу за открытие прерывистой структуры (расщепленности) генов.

1998 — 15 лет после вручения Нобелевской премии по физиологии и медицине Р.Ф. Фурчготту, Ф. Мюряду и Л.Дж. Игнарро за открытия, касающиеся окиси азота (NO) как сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе.

1998 — расшифрован геном червя *Caenorhabditis elegans*. Первая публикация в «Science» в декабре 1998 г. Полное завершение проекта в 2002 г.

2003 — полная расшифровка генома человека.

2003 — основание Российского общества биотехнологов им. Ю.А. Овчинникова.

ПЕРСОНАЛИИ

150 лет со дня рождения В.И. Вернадского (1863–1945).

130 лет со дня рождения немецкого биохимика Отто Варбурга (1883–1970), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1931 г. за открытие природы и механизма действия дыхательного фермента.

125 лет со дня рождения и 40 лет со дня смерти Э.А. Ваксмана (1888–1973). Родился на территории дореволюционной России, в 1911 г. эмигрировал в США. Открыл стрептомицин, за что был удостоен Нобелевской премии в 1952 г.

115 лет со дня рождения и 45 лет со дня смерти Х.У. Флори (1898–1968). За открытие пенициллина ему совместно с А. Флемингом и Э. Чейном в 1945 г. была присуждена Нобелевская премия.

110 лет со дня рождения шведского биохимика А.Х.Т. Теорелля (1903–1982). Нобелевская премия 1955 г. за открытия, касающиеся природы и способа действия окислительных ферментов.

110 лет со дня рождения американского генетика Дж.У. Бидла (1903–1989). Нобелевская премия 1958 г. по физиологии и медицине (половинная совместно с Э. Тейтемом; вторая половина была присуждена Дж. Ледербергу).

110 лет со дня рождения американского генетика Дж. Снелла (1903–1996), первооткрывателя МНС, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1980 года (совместно с Ж. Доссе и Б. Бенасеррафом).

110 лет со дня рождения А.А. Прокофьевой-Бельговской (1903–1984), известного отечественного цитогенетика.

105 лет со дня рождения американского биохимика Алфреда Херши (1908–1997), автора одного из ключевых экспериментов в молекулярной биологии (1952). Нобелевская премия по физиологии и медицине 1969 г. (вместе с М. Дельбрюком и С. Лурия).

95 лет со дня рождения Фредерика Сенгера (родился 13 августа 1918 г.), выдающегося английско-го биохимика. Единственный в мире ныне здравствующий дважды Нобелевский лауреат по химии (4-й за всю историю премий): 1958 г. — за исследование структуры белков, прежде всего инсулина; 1980 г. — половинная премия вместе с У. Гилбертом за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах (другая половина была вручена Полу Бергу за рекомбинантную ДНК).

95 лет со дня рождения Эдвина Кребса (1918–2009). Нобелевская премия 1992 г. (совместно с Эдмондом Фишером) за открытие обратимого фосфорилирования белков — не путать с Хансом Кребсом, первооткрывателем одноименного цикла (трикарбоновых кислот).

95 лет со дня рождения Артура Корнберга (1918–2007), выдающегося американского биохимика, лауреата Нобелевской премии 1959 г. (совместно с С. Очоа) за исследования механизма биосинтеза РНК и ДНК.

85 лет со дня рождения Дж. Уотсона (род. в 1928 г.), автора (вместе с Ф. Криком) феноменального открытия в молекулярной биологии (открытия XX века) — двойной спирали ДНК. Нобелевский лауреат 1962 г. (совместно с Ф. Криком и М. Уилкинсом).

85 лет со дня рождения Даниела Натанса (1928–1999). Нобелевская премия 1978 г. за открытие ферментов рестрикции (совместно с В. Арбером и Г. Смитом).

75 лет со дня рождения американского биохимика Дэвида Балтимора (род. в 1938 г.). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1975 года (совместно с Р. Дульбекко и Х.М. Теминим) за открытия, касающиеся взаимодействия между онкогенными вирусами и генетическим материалом клетки.

70 лет со дня рождения Ричарда Дж. Робертса (род. в 1943 г. в Дерби, Англия), лауреата Нобелевской премии 1993 г. (совместно с Ф.А. Шарпом) за открытие прерывистой структуры (расщепленности) генов.

60 лет со дня рождения Раифа Гаяновича Василова (род. в 1953 г.), доктора биологических наук, профессора, президента Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, главного редактора журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова».

70 лет со дня смерти Н.И. Вавилова (1887–1943), выдающегося отечественного биолога, генетика, селекционера.

25 лет со дня смерти Ю.А. Овчинникова (1934–1988), крупного отечественного молекулярного биолога, вице-президента АН СССР.

20 лет со дня смерти Северо Очоа (1905–1993), испанца по происхождению, известного энзимолога, лауреата Нобелевской премии 1959 г. (совместно с А. Корнбергом).

20 лет со дня смерти американского биохимика Роберта Холли (1922–1993), удостоенного Нобелевской премии в 1968 году за расшифровку генетического кода (совместно с М. Ниренбергом и Х.Г. Кораной).

СОБЫТИЯ 2013 ГОДА

К 60-летию профессора Р.Г. Василова



4 января 2013 года исполнилось 60 лет со дня рождения Раифа Гаяновича Василова, президента Общества биотехнологов имени Ю.А. Овчинникова, главного редактора журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова».

Р.Г. Василов родился в городе Мамадыш Республики Татарстан. По окончании средней школы с золотой медалью поступил на химический факультет Казанского государственного университета, который окончил в 1975 году с отличием. В студенческие годы начал заниматься научной работой в знаменитой Казанской школе химиков Арбузовых. Это во многом определило его дальнейшую судьбу. Он был рекомендован и поступил в аспирантуру при Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина АН СССР (Москва), в которой обучался под руководством академика Ю.А. Овчинникова. Защитил диссертацию на степень кандидата химических наук.

Затем по стипендии имени А.П. Карпинского проходил стажировку в ФРГ, в Институте генетики Кельнского университета под руководством профессора Клауса Раевского, где овладел новейшими по тому времени методами, в том числе иммунохимическими с использованием моноклональных антител. После зарубежной командировки был зачислен в штат Института

биоорганической химии АН СССР. В 1991 году им была защищена диссертация «Моноклональные антитела в иммунохимических исследованиях белков и гликопротеинов» на степень доктора биологических наук. Впоследствии ему было присвоено звание «профессор». Он является автором более 150 научных работ (не считая многочисленных общественных публикаций, интервью, Интернет-сообщений и т.д.).

С 1988 года он становится генеральным директором НПО «Биотехнология» (Москва) и руководил этим учреждением до конца 1990-х годов. В 2003 году вместе с академиком РАН А.А. Воробьевым стал инициатором создания Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, в котором занял ключевой пост вице-президента. С 2006 года по настоящее время является президентом этого общества, совмещая данную должность с рядом ассоциированных обязанностей (исполнительный директор Союза предприятий биотехнологической отрасли, президент Международного конгресса «ЕвразияБио»). В течение двух лет исполнял обязанности президента Федерации азиатских биотехнологических ассоциаций. В последнее время возглавлял Институт биоэкономики при Российской экономической академии им. Г.В. Плеханова, сейчас руководит Научно-технологическим комплексом биоэнергетики в Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт».

Работа Р.Г. Василова в рамках Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова характеризуется высокой эффективностью, разносторонностью, вовлечением большого числа заинтересованных специалистов, постоянной нацеленностью на полезный результат. Это выражается в проведении многочисленных конференций, съездов, симпозиумов, школ-семинаров по вопросам биотехнологии и физико-химической биологии на международном, общероссийском и региональном уровнях.

Раиф Гаянович является творческой личностью, горячим патриотом и стойким пропагандистом биотехнологических идей в нашей стране и мире. Он своим примером показывает, как многого может достичь отдельный человек, идущий трудной, но верной дорогой и не отвлекающийся на конъюнктуру или легкий, но бессодержательный успех.

Редколлегия и редсовет журнала сердечно поздравляют юбиляра со славной датой в его личной жизни и желают дальнейших успехов в деле возрождения отечественной биотехнологии.

**XXV Зимняя международная научная школа
«Перспективные направления физико-химической
биологии и биотехнологии», посвященная 30-летию
Научно-образовательного центра ИБХ РАН
(Москва, 11–15 февраля 2013 г.)**

11–15 февраля 2013 года в Москве, в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН состоялась XXV Зимняя международная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Это мероприятие, с одной стороны, посвящено 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН, а, с другой, приурочено к 25-летию со дня смерти академика Ю.А. Овчинникова.

В период проведения Школы работали 9 секций по актуальным направлениям физико-химической биологии и биотехнологии, на которых выступали с докладами в основном молодые научные сотрудники:

1. Структура и функции белков и пептидов. Биокатализ.
2. Структура и функции нуклеиновых кислот. Механизмы генетических процессов.
3. Структура и функции углеводов, липидов и низкомолекулярных биорегуляторов.
4. Физико-химические методы исследования биологически активных соединений.
5. Молекулярные механизмы узнавания биомолекул и передачи сигналов в клетке.
6. Молекулярные и клеточные основы иммунитета.
7. Молекулярные механизмы клеточных процессов и межклеточных взаимодействий.
8. Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии и бионанотехнологии.
9. Биомедицинские исследования.

Научно-методический уровень докладов был очень высок и их тематика вызывала интерес аудитории, что вызывало активное обсуждение.

В рамках Школы был проведен Конкурс молодых ученых в двух возрастных группах — до 28 лет и до 35 лет. Наиболее многочисленный состав собрался в младшей группе, и именно в ней была самая острая конкуренция.

В результате проведения открытого конкурса победили в основном сотрудники и учащиеся московских научно-исследовательских институтов и вузов. Периферийные научные коллективы были представлены на этот раз менее широко и пропорционально меньше было их в числе призеров.

**Бизнес-миссия
по вопросам расширения российско-корейского
сотрудничества в биотехнологии
(Сеул, 20–23 марта 2013 г.)**

20–23 марта 2013 года в Сеуле (Республика Корея) состоялась Бизнес-миссия представителей российских биотехнологических компаний. Ее организатором явилось Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова при поддержке Министерства экономического развития РФ, Торгпредства России в Республике Корея, Союза предприятий биотехнологической отрасли. Партнером по организации мероприятия со стороны Республики Корея была Bioindustry Association of Korea.

Цель мероприятия заключалась в расширении российско-корейского сотрудничества и партнерства в области биотехнологии, установлении новых контактов между специалистами, презентация российских биотехнологических компаний и т.д. В результате проведения миссии эта цель была достигнута.

Российская делегация была довольна многочисленной. В бизнес-миссии приняли участие 18 представителей российских биотехнологических компаний, институтов и кластеров из Москвы, Нижнего Новгорода, Брянска, Красноярского и Приморского краев, Республики Татарстан, Республики Мордовия, Республики Чувашия, а также делегация Правительства Республики Башкортостан во главе с вице-премьером Д.В. Шароновым.

Программа бизнес-миссии была очень насыщенной. Она включала в себя проведение переговоров российских компаний с представителями таких известных биотехнологических корейских компаний, как «Celltrion Healthcare, CO. Ltd.», «Crucell», «Isu», «Genexine», а также Корейского института Пастера — резидентов крупнейшего в Республике Корея технопарка Korea BIO.

Российским специалистам была предоставлена возможность ознакомления с работой Бунданского госпиталя при Сеульском государственном университете биотехнологий, посещения международной выставки медицинского оборудования KIMES 2013 и участия в других мероприятиях. Среди них следует особо отметить проведение в рамках бизнес-миссии Российско-Корейского форума по вопросам развития сотрудничества в области биотехнологий, организованного Торгпредством России в Республике Корея совместно с корейскими организациями. На форуме был подписан Меморандум о сотрудничестве между Союзом предприятий биотехнологической отрасли России и Корейской биопромышленной

ассоциацией. Кроме того, достигнуты договоренности о разработке соглашения о сотрудничестве в сфере высоких медицинских технологий, включая биофармацевтические технологии, между Союзом предприятий биотехнологической отрасли России и Бунданским госпиталем. Корейские компании были приглашены для участия в

будущих мероприятиях в области биотехнологии, которые планируются провести в Москве в 2013–2014 гг.

В целом результаты бизнес-миссии подтвердили заинтересованность Республики Корея в реализации совместно с российскими партнерами крупных высокотехнологических проектов в биотехнологической сфере.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2013 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

22–25 апреля 2013 года в Чикаго (США) состоится конгресс биотехнологов «BIO 2013 International Convention». Это — регулярное широкомасштабное мероприятие в биотехнологической сфере. *Информация:* <http://www.convention.bio.org>.

15–16 мая 2013 года в Амстердаме (Нидерланды) будет проходить XXXIV Международная конференция по морским наукам и аквакультуре (International Conference on Marine Science and Aquaculture — ICMSA 2013). Эта традиционная конференция объединяет ведущих специалистов в сфере морской биотехнологии и аквакультур. Предыдущие конференции состоялись в Амстердаме, Бали, Бангалоре, Бангкоке, Барселоне, Берлине, Будапеште, Каире, Кейптауне, Копенгагене, Дубае, Флоренции, Гейдельберге, Гонконге, Стамбуле, Йоханнесбурге, Кракове, Куала-Лумпуре, Лондоне, Люцерне, Мадриде, Малаге, Мельбурне, Нью-Йорке, Ницце, Осаке, Осло, Париже, Пенанге, Перте, Пхукете, Праге, Рио-де-Жанейро, Риме, Сингапуре, Стокгольме, Сиднее, Токио, Торонто, Венеции, Вене.

К предстоящему мероприятию будет выпущен сборник научных трудов, при этом материалы будут проиндексированы в Thomson Reuters, CiteSeerX, Google Books и Google Scholar, EBSCO, Scopus, ЭРА и ProQuest. Планируется специальный выпуск журнала по достижениям в морских науках и аквакультуре, в который будут включены лучшие работы после соответствующего рецензирования. *Контакты:* NH Naarden Hotel, IJsselmeerweg 3, 1411 AA Naarden, The Netherlands. Tel: +31 (0)35 695 15 14; Fax: +31 (0)35 695 10 89. <http://www.waset.org/conferences/2013/amsterdam/icmsa>.

24–25 мая 2013 года в Екатеринбурге будет организована Международная научно-практическая конференция «Проблемы развития биотехнологии в аграрной сфере». Конференция проводится при поддержке Оргкомитета по подготовке к Уральской международной выставке и форуму промышленности и инноваций «ИННОПРОМ-2013».

Направления конференции:

- сельскохозяйственная биотехнология,

- биотехнологии в пищевой и перерабатывающей промышленности,
- биотехнологии в сфере охраны окружающей природной среды,
- развитие образования и науки в сфере биотехнологии,
- международное сотрудничество в сфере биотехнологии.

Планируется издание сборника статей.

Контакты: 620075 Екатеринбург, ул. К. Либкнехта, 42, Уральская ГСХА, каб. 1307. Тел.: +7 (343) 221-40-36, моб. 8-912-639-25-87, факс: +7 (343) 350-97-56. E-mail: nich_usaca@mail.ru.

16–19 июня 2013 года в Монреале (Канада) планируется проведение 10-го ежегодного всемирного конгресса по индустриальной биотехнологии (10th Annual World Congress on Industrial Biotechnology). Ожидается участие около 1000 представителей из более 35 стран. Повестка дня включает в себя пленарные сессии, симпозиумы, постеры, партнеринг. *Информация:* <http://www.bio.org/events/conferences/world-congress>.

25–28 июля 2013 года в Москве, в МГУ имени М.В. Ломоносова будет организована Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии (МССМВ'13). Конференция проходит раз в два года. Организаторы конференции: Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича, Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Некоммерческое партнерство «Семинар биоинформатики», Научный совет по биофизике РАН.

Основные направления МССМВ'13:

- анализ последовательностей ДНК и белка;
- структура биополимеров;
- взаимодействие белков с лигандами;
- молекулярная эволюция;
- геномика и протеомика;
- следующие поколения секвенирования;
- автоматизированная аннотация геномов и онтологий;
- системная биология (модели и сети);

-
- биоалгоритмы;
 - образование в области биоинформатики.

В структуре конференции предусмотрены доклады, стендовые сообщения, круглые столы. Рабочий язык — английский. Избранные работы участников МССМВ'13 будут опубликованы после конференции в «Journal of Bioinformatics and Computational Biology».

Информация: 127994 Москва, Б. Каретный пер., 19, Институт проблем передачи информации РАН, МССМВ'13. Тел.: +7 (495) 939-54-14; факс: +7 (495) 135-15-37. E-mail: mscmb@belozersky.msu.ru. <http://mccmb.genebee.msu.ru/2013/index.html>.

3–7 ноября 2013 года в Лас-Пальмас-де-Гран-Канария (Испания) состоится конференция по аквакультуре — Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture. На этой конференции будут подведены итоги 40-летних исследований в области аквакультур и будут определены перспективы дальнейших работ по данной проблеме.

Направления конференции:

- Аквакультура инкубаторов: научные достижения и будущие исследования.

- Объединение селекции с помощью маркеров с классическими программами выбора.
- Трансдисциплинарные потребности в научных исследованиях для развития аквакультуры в сельской экономике.
- Сырье и кормовые ингредиенты, необходимые для будущего аквакультуры.
- Взаимодействия аквакультуры и окружающей среды.
- Научно-исследовательские учреждения и стратегии исследований в области аквакультуры.

Справки: Palacio de Congresos de Canarias, Avenida Principe de Asturias s/n 35010. Las Palmas de Gran Canarias. Тел.: + 34 928 491 770. <http://www.aquaculture-conference.com/index.html>.

21–22 ноября 2013 года в Москве состоится очередной съезд Общества биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова, посвященный 10-летию со дня основания общества. Более подробные сведения будут представлены позднее. *Информация:* Тел.: +7 (495) 648-09-13. E-mail: obr@biorosinfo.ru. <http://www.biorosinfo.ru>.

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

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).

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



Подписано к печати 22.03.13
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основной организационной деятельностью ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru