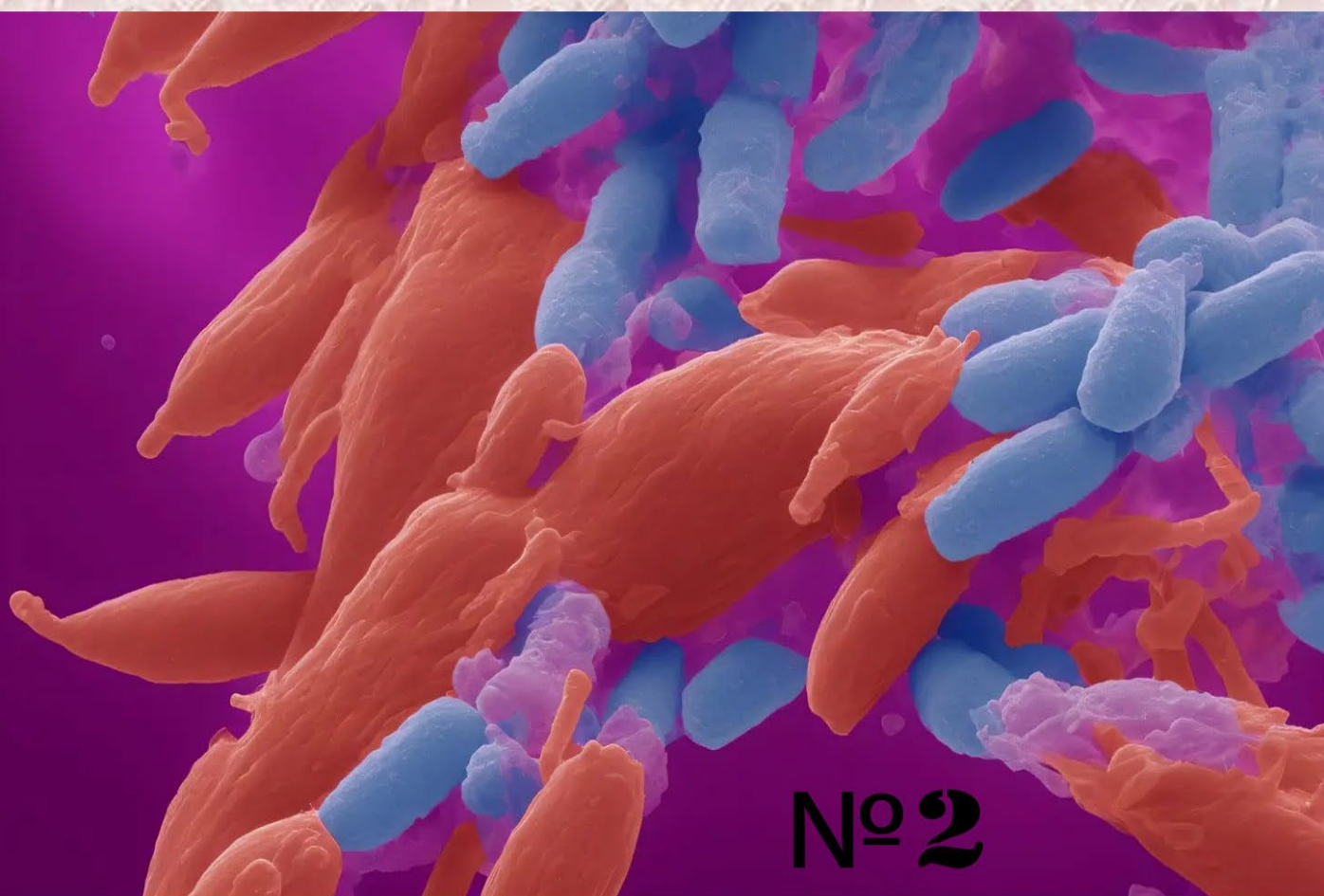


16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№ 2

2024

ISSN 2304-4691

**Основан в 2012г.
г. Воронеж**

Актуальная биотехнология

№ 2

2024



Учредитель: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Главный редактор

д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

д.б.н., профессор Е.Н. Ефименко

д.б.н., профессор В.В. Ревин

д.б.н., профессор Д.А. Черенков

д.б.н., профессор С.С. Антипов

д.т.н., профессор В.И. Панфилов

д.т.н., профессор Е. В. Богданова

д.т.н., профессор А.А. Дерканосова

д.т.н., профессор Ю.А. Максименко

к.т.н., доцент А.С. Муравьев

к.т.н., доцент Е.П. Анохина

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Официальный сайт «Актуальная биотехнология» www.actbio-vsuet.ru

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012

Ответственный секретарь: ДЕРКАНОСОВА А.А. (эл. почта: post@actbio-vsuet.ru)

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-83978 от 21 сентября 2022 г.

Адрес издательства и отдела полиграфии ФГБОУ ВО «ВГУИТ»

394036, Воронеж, пр. Революции д.19 ауд.11

тел./факс: (473) 255-37-16

E-mail: post@actbio-vsuet.ru

Сдано в набор 01.11.2024. Подписано в печать 06.11.2024

Выход в свет: 08.11.2024

Усл. печ. л. 14,5 Тираж 500 экз. Заказ.

Цена – свободная.

© ФГБОУ ВО

«Воронеж. гос. ун-т инж.
технол.», 2024

Содержание

МАТЕРИАЛЫ XII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ: НАУКА И ПРАКТИКА»

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ТРАНСГЕНОЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ОНКОГЕНЕЗОМ И ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ Е.А. Степаненко, И.В. Макарова, А.А. Ванюшенкова, Л.Е. Андреева, Н.А. Щербатова, Т.П. Герасимова, В.В. Ненашева, В.З. Тарантул	5
СПОСОБ АКТИВАЦИИ ЙОДАККУМУЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ И СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, В.В. Яглов	9
ИЗУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ НОВЫМ ШТАММОМ <i>PENICILLIUM SP. 122</i> . И.С. Климашов, Л.Б. Глухова, Д.А. Ивасенко	12
ИЗУЧЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЛАВНОГО АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ ВЕТ V 1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК РЕСПИРАТОРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЛИНИИ CALU-3 И ПЕРВИЧНЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова	13
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОСНОВНОГО АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ ОЛЬХИ ALN G 1 С ЭПИТЕЛИЕМ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ А.Е. Потапов, Д.Н. Мельникова, Т.В. Овчинникова, И.В. Богданов	14
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНАЛОГА АС-AMP2 ИЗ АМАРАНТА А.А. Герасимова, Емельянова Э.М., И.В. Богданов, Е.И. Финкина, Т.В. Овчинникова	15
АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ФЕНОЛОКСИДАЗ АЗОСПИРИЛЛ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕСТРУКЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ М.А. Купряшина, Е.Г. Пономарева	16
МЕТАБОЛИЗМ КРАСНОГО ФОСФОРА В ФОСФАТ А.З. Миндубаев, А.Р. Галимова, Э.Л. Гоголашвили, Э.В. Бабынин	18
ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА П.С. Шинкевич, К.А. Вельможина, Н.В. Зибарев, Н.А. Политаева, А.М. Опарина	19
ПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ КАРБОНИЗАЦИИ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ: СИНТЕЗ, ПРИМЕНЕНИЕ И МЕХАНИЗМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ Т.В. Бауэр, Т.М., В.А. Поляков, Т.М. Минкина, О.Е. Хронюк, Ю.В. Бауэр, А.В. Барахов	23
ГОРМОНАЛЬНЫЙ БАЛАНС СИСТЕМЫ ПЫЛЬЦА-ПЕСТИК ПЕТУНИИ ДВУХ КЛОНОВ ДО ОПЫЛЕНИЯ Ю.В. Минкина	28
БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ТИПА «КЛЕТКИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫХ МАТРИЦАХ»: ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ Д.Г. Лаврова, А.Н. Звонарев, Т.Г. Хонина	29
СОПИРОЛИЗ ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД И ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ КАК УСТОЙЧИВАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ Т.М. Минкина, Т.В. Бауэр, А.Г. Тимофеева, С.С. Манджиева	31
НОВЫЙ МЕТАНОТРОФ ИЗ ИЛА ПРЕСНОВОДНОГО ОЗЕРА Е.Н. Капаруллини, Н.В. Доронина	36
МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ: БИОИНЖЕНЕРИЯ И НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН О.Н. Пономарева, Л.И. Трубицина, А.А. Моисеева, А.В. Абдуллатыпов, И.В. Трубин, К.А. Егоров, С.В. Алферов, А.А. Леонтьевский	37
КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ КАК СПОСОБ КОММУНИКАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ В СИСТЕМЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА Н.В. Будаговская	42
ИЗУЧЕНИЕ БУФЕРНОЙ СПОСОБНОСТИ ПОЧВЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К КАДМИЮ М.В. Бурачевская, Т.М. Минкина, И.В. Замулина, А.В. Щербаков, Е.В. Лацынник	44
АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ ПАУ ИЗ ПОЧВ УГЛЕОТВАЛОВ ВОДОЙ В СУБКРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ С.Н. Сушкова, Т.С. Дудникова, Е.Г. Шуваев, А.А. Немцева, Е.М. Антоненко	47
ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ БИОМАССЫ А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, В.Г. Матвеева	50
ПОЛУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПЛЕНОК ДЛЯ УПАКОВКИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА Б.Б. Тихонов, Д.Р. Лисичкин, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман, А.И. Сидоров	52
ВЛИЯНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ ХВОЙНЫХ ЛЕСОВ А.К. Квиткина, Н.С. Смирнов	54
АНАЛИЗ ПРЕДОТВРАЩЕННОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО УЩЕРБА ВСЛЕДСТВИЕ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРЕНИЯ КРС Н.В. Малков, Н.А. Политаева	57
ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННОГО И ЭКЗОГЕННОГО МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА НА МИНЕРАЛИЗАЦИЮ И ГУМИФИКАЦИЮ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ А.К. Квиткина	59
МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩИЕ И АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СУПЕРНАТАНТОВ ИЗ ТОМАТОВ МЕСТНЫХ СОРТОВ А.В. Гребенщиков, А.Е. Чусова, В.А. Иванова, А.А. Пронькина	61
ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА СОСТАВА АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА <i>K. PNEUMONIAE</i> А.В. Солдатенкова, Д.С. Мартынова, С.А. Лазарев, А.А. Калашин, Н.А. Михайлова	62

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ТРАНСГЕНОЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ОНКОГЕНЕЗОМ И ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ

Е.А. Степаненко¹, И.В. Макарова¹, А.А. Ванюшенкова¹, Л.Е. Андреева¹, Н.А. Щербатова¹,
Т.П. Герасимова², В.В. Ненашева¹, В.З. Тарантул¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт, Москва, Россия

² ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто встречающимся у женщин во всем мире среди других видов злокачественных заболеваний и составляет 10 % от всех видов рака [1, 2]. По современным оценкам, в патогенез РМЖ могут быть вовлечены как генетические и гормональные, так и иммунологические факторы [3]. Накапливаются данные, что РМЖ может возникнуть из-за нарушения в работе иммунной системы [4], а также процессов апоптоза, которые в норме участвуют в инволюции молочных желез после окончания лактации.

Основной известной функцией генов мультигенного (> 80 членов) семейства TRIM (англ. tripartite motif) является участие в процессах врожденного иммунитета [5, 6]. Эти гены также вовлечены и в ряд других процессов в клетке, в частности, в апоптоз и аутофагию [7]. В последние годы накоплены многочисленные данные об участии многих членов этого семейства TRIM в развитии разных типов опухолей [8, 9]. В частности, установлено, что, по меньшей мере, пять десятков генов TRIM, наряду с их участием в работе врожденной иммунной системы, вовлечены в процесс образования РМЖ. Например, TRIM3 может ингибировать сигналинг p53 в клетках РМЖ [10]. TRIM11 регулирует пролиферацию и апоптоз клеток РМЖ [11]. TRIM16 способен подавлять рост клеток РМЖ [12]. Было показано, что TRIM29 является супрессором РМЖ [13]. TRIM32 способен поддерживать выживаемость клеток при РМЖ и снижать скорость апоптоза при обработке клеток цисплатином [14]. TRIM44 усиливает передачу сигнала через фактор NF-κB и способствует развитию опухолей [15]. Таким образом, очевидно, что многие гены семейства TRIM оказывают существенное и разнообразное по своему механизму воздействие на возникновение и развитие РМЖ.

Большинство белков TRIM обладают свойствами E3-убиквитинлигаз, за которые отвечает домен RING. Однако у ряда TRIM это домен отсутствует, например, у TRIM14. Вместе с тем соответствующий ген также принимает активное участие в онкогенезе опухолей различного типа [16–19]. Было показано, что ген TRIM14 повышено экспрессируется в тканях РМЖ у человека и его нокдаун в линиях клеток РМЖ приводит к ингибированию клеточной пролиферации и усилению апоптоза [20]. Практически все приведенные выше данные были получены на культурах клеток РМЖ, т. е. *in vitro*. Более важными являются исследования действия генов *in vivo*. Такую возможность представляет технология трансгеноза. В настоящей работе приведены результаты исследования РМЖ, возникающего у трансгенных мышей в результате повышенной экспрессии трансгена TRIM14.

Результаты и обсуждение. Было обнаружено, что у двух полученных нами ранее линий трансгенных мышей, содержащих ген TRIM14 человека [21], через 8–10 месяцев после рождения начинают появляться опухоли молочной железы и в течение жизни (до 29 месяцев) они возникают у 25–30 % нерожавших мышей и у 75–85 % лактировавших животных (рисунок 1). Эти свойства передаются по наследству. При этом у контрольной линии мышей (исходной гибридной линии C57BLxSWA, использованной для получения трансгенных линий) опухоли образовывались достоверно в значительной меньшей степени и в более позднем возрасте. Полученные линии трансгенных мышей были использованы нами в качестве модели РМЖ, ассоциированного с беременностью (англ. pregnancy associated breast cancer, PABC), для изучения роли генов врожденной иммунной системы в возникновении и развитии этого редкого типа злокачественного заболевания.

Был проведен анализ экспрессии ряда генов, кодирующих субъединицы основных транскрипционных факторов врожденного иммунитета, которые по данным литературы ассоциированы с TRIM14 в опухолевых линиях клеток: NF-κB (канонический путь, субъединицы NF-κB1, RelA [18]); неканонический путь, субъединицы NF-κB2, RelB [22]); AP-1 (субъединицы JunB, c-Jun [23]), а также факторов транскрипции STAT1 и 3 [24]). Результаты количественной ПЦР в реальном времени представлены в таблице 1. Анализ проводился по трем линиям мышей – контрольной и двум трансгенным (Tg1 и Tg4) в нормальных молочных железах (НМЖ) и опухолях молочных желез (ОМЖ). Данные анализировались отдельно для самок моложе 16 месяцев и старше 16 месяцев, рожавших и нерожавших.

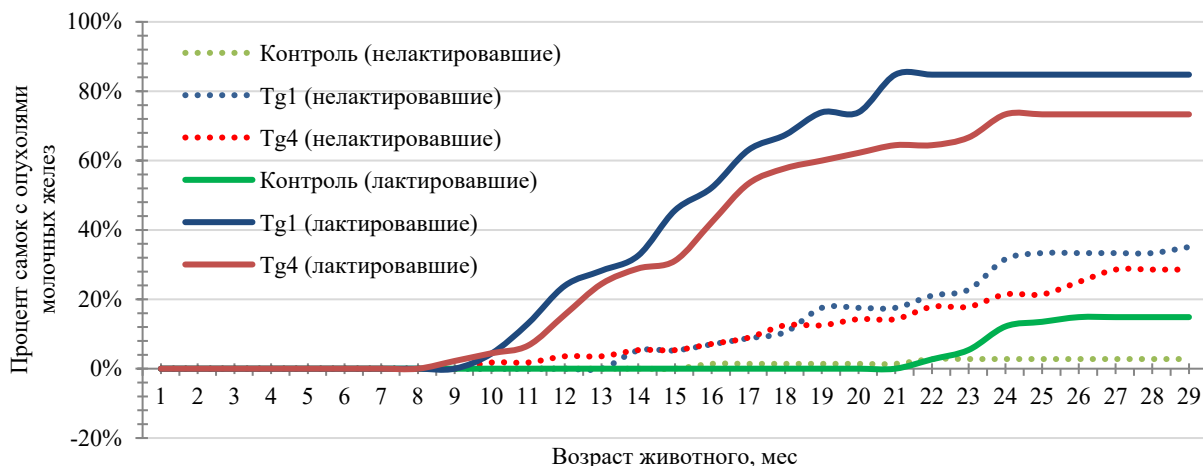


Рисунок 1. Возникновение РМЖ у самок контрольных и трансгенных (Tg1 и Tg4) линий мышей в зависимости от возраста и лактации. (Использовалось не менее 100 животных каждой линии)

Таблица 1. Изменение транскрипции ряда генов врожденной иммунной системы в опухолях и нормальных молочных железах трансгенных животных по сравнению с контрольными мышами

Гены	Возраст до 16 месяцев				Возраст свыше 16 месяцев			
	Нерожавшие		Рожавшие		Нерожавшие		Рожавшие	
	НМЖ	ОМЖ	НМЖ	ОМЖ	НМЖ	ОМЖ	НМЖ	ОМЖ
NF-κB1	Синий	Белый	Синий	Красный	Синий	Белый	Синий	Белый
RelA	Синий	Белый	Красный	Синий	Синий	Белый	Синий	Синий
NF-κB2	Красный	Красный	Красный	Красный	Синий	Красный	Белый	Синий
RelB	Синий	Белый	Синий	Синий	Красный	Синий	Синий	Белый
JunB	Синий	Красный	Синий	Красный	Синий	Красный	Белый	Синий
c-Jun	Синий	Белый	Белый	Красный	Синий	Красный	Синий	Синий
Stat1	Синий	Синий	Синий	Белый	Синий	Белый	Белый	Белый
Stat3	Синий	Синий	Синий	Синий	Синий	Синий	Синий	Синий

НМЖ – нормальные молочные железы, ОМЖ – опухоль молочной железы. Синим цветом отмечено снижение экспрессии гена по сравнению с контролем, красным – повышение экспрессии, белым – отсутствие изменений

Было обнаружено, что уровни мРНК большинства транскрипционных факторов в трансгенных линиях в НМЖ понижены по сравнению с контрольными мышами, за исключением NF-κB2 у рожавших и нерожавших особей до 16 мес, RelA – у рожавших мышей до 16 мес и RelB – у нерожавших мышей старше 16 мес. В опухолях у мышей до 16 мес уровни транскрипции повышаются у генов, кодирующих NF-κB2 (как рожавшие, так и нерожавшие), NF-κB1 (рожавшие), JunB (как рожавшие, так и нерожавшие), c-Jun (рожавшие). У мышей старше 16 мес в опухолях у нерожавших мышей наблюдается увеличение транскрипции генов NF-κB2, JunB и c-Jun по сравнению с контрольными животными.

Транскрипционные факторы NF-κB регулируют пролиферацию клеток, их активация предупреждает TNFα-индуцированный апоптоз. В большинстве случаев опухолевые клетки повышено экспрессируют NF-κB, неограниченно пролиферируют и невосприимчивы к сигналам апоптоза. NF-κB, с одной стороны, может участвовать в защите против опухолей, с другой стороны, может активировать воспаление и запускать транскрипцию различных онкогенов, в зависимости от типа клеток. На уровне мРНК в НМЖ наблюдалось снижение экспрессии субъединиц NF-κB, отвечающих за канонический путь активации врожденного иммунитета. Возможно, снижение уровня NF-κB, которое происходило в НМЖ трансгенных мышей, уменьшает эффективность локальной противоопухолевой защиты.

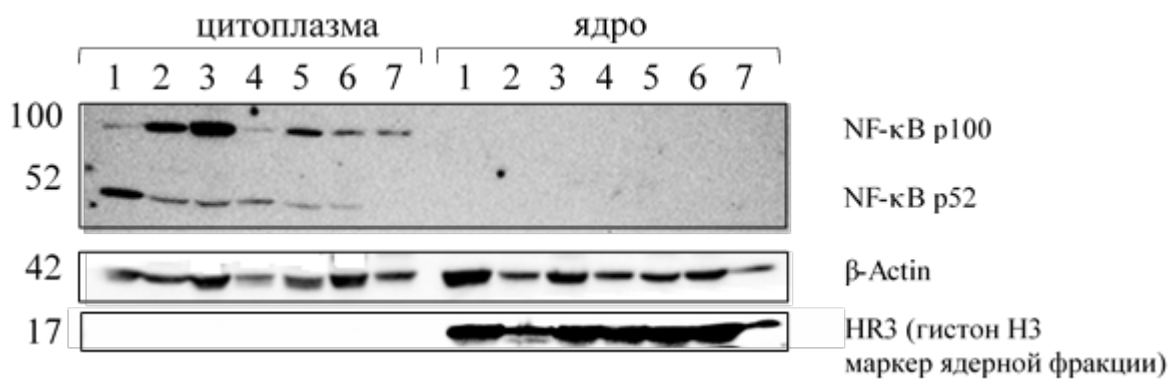


Рисунок 2. Вестерн-блот анализ количества NF-κB2 в МЖ и ОМЖ контрольных и трансгенных линий мышей: 1 – ОМЖ, К, рожавшая; 2 – ОМЖ, Tg1, рожавшая; 3 – ОМЖ, Tg4, рожавшая; 4 – ОМЖ, К, нерожавшая; 5 – ОМЖ, Tg1, нерожавшая; 6 – ОМЖ, Tg4, нерожавшая; 7 – МЖ, К, нерожавшая

При этом уровень мРНК NF-κB2 в МЖ трансгенных линий выше, чем у контрольной линии, что возможно говорит о более высоком базовом уровне экспрессии этой субъединицы при гиперэкспрессии TRIM14. Однако следует отметить, что важно не только количество транскрипционного фактора, но и его распределение между ядром и цитоплазмой – чем больше его количество в ядре, тем сильнее его активность. Поэтому из тканей ОМЖ и МЖ были выделены фракции цитоплазматических, митохондриальных и ядерных белков и проанализировано в них количество белков NF-κB2 и RelB (рисунки 2, 3). Для анализа были взяты ткани самок моложе 16 мес. Во фракции митохондриальных белков экспрессия NF-κB2 отсутствовала (данные не приведены). Интересно, что обе формы субъединицы NF-κB2 присутствовали только в цитоплазме (рисунок 2). Можно отметить, что активированная форма субъединицы (p52) присутствует только в ОМЖ, в норме (№ 7) ее нет, причем ее наибольшее количество определяется в ОМЖ контрольной линии, а в трансгенных опухолях, напротив, присутствует в большом количестве неактивированная форма p100. Таким образом, несмотря на увеличенную транскрипцию NF-κB2 у трансгенных мышей в МЖ и в ОМЖ, этот белок, по-видимому, неактивен в раковых клетках.

Анализ содержания второй субъединицы неканонического пути NF-κB – RelB (рисунок 3) показал, что наибольшее количество этого белка присутствует в цитоплазме. При этом переход этого белка в ядро практически не происходит. В опухолях как контрольной, так и обеих линий трансгенных мышей, уровень RelB в цитоплазме значительно выше по отношению к его уровню в ядре. Таким образом, обе субъединицы неканонического пути присутствуют в основном в цитоплазме раковых клеток, но не транслоцируются в ядро. Это указывает на то, что неканонический путь неактивен в опухолях молочной железы мышей.

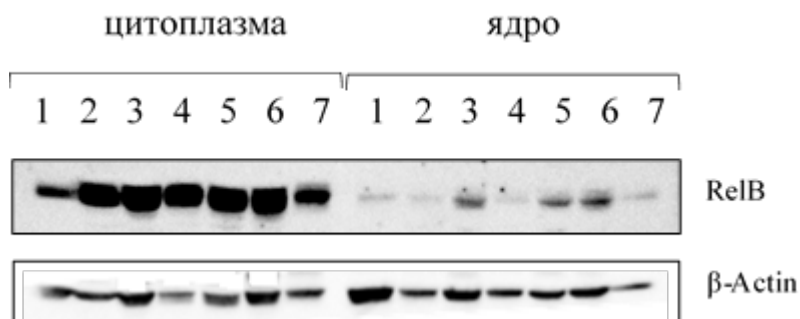


Рисунок 3. Вестерн-блот анализ количества RelB в МЖ и ОМЖ контрольных (К) и трансгенных (Tg) мышей: 1 – ОМЖ, К, рожавшая; 2 – ОМЖ, Tg1, рожавшая; 3 – ОМЖ, Tg4, рожавшая; 4 – ОМЖ, К, нерожавшая; 5 – ОМЖ, Tg1, нерожавшая; 6 – ОМЖ, Tg4, нерожавшая; 7 – МЖ, К, нерожавшая.

Заключение. Таким образом, у трансгенных мышей гиперэкспрессия гена ТРИМ14 человека приводила к увеличению частоты и снижению возраста образования РМЖ. При этом опухолеобразование в значительно большей степени было выражено у рожавших мышей, чем у нерожавших, что характерно для такого редкого типа РМЖ у женщин, как РАВС. Результаты анализа экспрессии транскрипционных факторов, вовлеченных в работу врожденной иммунной системы, в ОМЖ и в НМЖ трансгенных мышей по сравнению с контрольными животными позволяют предположить, что ТРИМ14 участвует в опухолеобразовании у трансгенных мышей через сигнальные пути врожденного иммунитета NF-κB1 и AP-1, так как экспрессия субъединиц этих факторов повышалась только в ОМЖ трансгенных мышей (NF-κB1, JunB и c-Jun). Неканонический путь NF-κB, по-видимому, неактивен как в НМЖ, так и ОМЖ трансгенных мышей. Метаболический путь STAT1/3 во всех опухолях или подавлялся, или оставался неизменным по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют о большом потенциале технологии трансгеноза для изучения онкогенной роли различных генов в системе *in vivo*.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018, 68(6), 394–424.
2. Coughlin SS. Epidemiology of breast cancer in women. *Adv Exp Med Biol*. 2019, 1152, 9–29.
3. Shihab I, Khalil BA, Elemam NM, Hachim IV, Hachim MY, Hamoudi RA, Maghazachi AA. Understanding the Role of Innate Immune Cells and Identifying Genes in Breast Cancer Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020, 12(8), 2226.
4. Friedenson B. Mutations in components of antiviral or microbial defense as a basis for breast cancer. *Functional & Integrative Genomics*. 2013, 13(4), 411–424.
5. Khan R, Khan A, Ali A, Idrees M. The interplay between viruses and TRIM family proteins. *Rev Med Virol*. 2019, 29, e2028.
6. van Gent M, Sparrer KMJ, Gack MU. TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu Rev Virol*. 2018, 5, 385–405.
7. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011, 11, 792–804.
8. Hatakeyama S. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci*. 2017, 42, 297–311.
9. Tarantul VZ. Many faces of TRIM family proteins on the field of oncoimmunology. *Universal J Oncology*. 2018, 1, 1–37.
10. Wang X, Zhang Y, Pei X, Guo G, Xue B, Duan X, Dou D. TRIM3 inhibits P53 signaling in breast cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2020, 20, 559.
11. Dai X, Geng F, Li M, Liu M. Tripartite motif containing 11 regulates the proliferation and apoptosis of breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2019, 41(4), 2567–2574.
12. Kim PY, Tan O, Liu B, Trahair T, Liu T, Haber M, Norris MD, Marshall GM, Cheung BB. High TDP43 expression is required for TRIM16-induced inhibition of cancer cell growth and correlated with good prognosis of neuroblastoma and breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2016, 374(2), 315–323.
13. Liu J, Welm B, Boucher KM, Ebbert MT, Bernard PS. TRIM29 functions as a tumor suppressor in nontumorigenic breast cells and invasive ER + breast cancer. *Am J Pathol*. 2012, 180(2), 839–847.
14. Zhao TT, Jin F, Li JG, Xu YY, Dong HT, Liu Q, Xing P, Zhu GL, Xu H, Yin SC, Miao ZF. TRIM32 promotes proliferation and confers chemoresistance to breast cancer cells through activation of the NF-κB pathway. *J Cancer*. 2018, 9(8), 1349–1356.
15. Kawabata H, Azuma K, Ikeda K, Sugitani I, Kinowaki K, Fujii T, Osaki A, Saeki T, Horie-Inoue K, Inoue S. TRIM44 Is a Poor Prognostic Factor for Breast Cancer Patients as a Modulator of NF-κB Signaling. *Int J Mol Sci*. 2017, 18(9), 1931.
16. Jin Z, Li H, Hong X, Ying G, Lu X, Zhuang L, Wu S. TRIM14 promotes colorectal cancer cell migration and invasion through the SPHK1/STAT3 pathway. *Cancer Cell Int*. 2018, 18, 202.
17. Shen W, Jin Z, Tong X, Wang H, Zhuang L, Lu X, Wu S. TRIM14 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by suppressing PTEN in colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2019, 11, 5725–35.
18. Su X, Wang J, Chen W, Li Z, Fu X, Yang A. Overexpression of TRIM14 promotes tongue squamous cell carcinoma aggressiveness by activating the NF-κB signaling pathway. *Oncotarget*. 2016, 7(9), 9939.
19. Sun W, Wang Y, Li D, Wu Y, Ji Q, Sun T. Tripartite motif containing 14: An oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020, 521, 360–367.
20. Hu G, Pen W, Wang M. TRIM14 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Apoptosis. *Oncol Res*. 2019, 27(4), 439–447.
21. Nenasheva VV et al. Human TRIM14 protects transgenic mice from influenza A viral infection without activation of other innate immunity pathways. *Genes Immun*. 2021, 22(1), 56–63.
22. Chen M, Zhao Z, Meng Q, Liang P, Su Z, Wu Y, Huang J, Cui J. TRIM14 Promotes Noncanonical NF-κB Activation by Modulating p100/p52 Stability via Selective Autophagy. *Adv Sci (Weinh)*. 2019, 7(1), 1901261.
23. Uchil PD, Hinz A, Siegel S, Coenen-Stass A, Pertel T, Luban J, Mothes W. TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity. *J Virol*. 2013, 87(1), 257–272.
24. Tan G, Xu F, Song H, Yuan Y, Xiao Q, Ma F, Qin FX, Cheng G. Identification of TRIM14 as a Type I IFN-Stimulated Gene Controlling Hepatitis B Virus Replication by Targeting HBx. *Front Immunol*. 2018, 9, 1872.

СПОСОБ АКТИВАЦИИ ЙОДАККУМУЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ И СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, г. Москва, Россия

Введение. В последние годы наблюдается рост числа заболеваний щитовидной железы у взрослых и детей во многих странах. Щитовидная железа является жизненно важным эволюционно древним органом. Она играет центральную роль в реакциях метаболизма, а также участвует в процессе роста и развития. По мнению специалистов, существенный вклад в развитии патологических процессов в щитовидной железе могут вносить эндокринные дисрапторы, способные нарушать секреторную деятельность железы и ее гипоталамо-гипофизарную регуляцию [1], а также влиять на йодаккумуляционную функцию щитовидной железы. Ещё одна проблема, стоящая достаточно остро во многих странах, – это йододефицит, который часто усугубляется воздействием эндокринных дисрапторов [2]. Транспорт йодидов в тироцит происходит против градиента концентрации и обеспечивается работой ионного канала в наружной цитоплазматической мембране. Этот канал формируется натрий-йодный симпортером (НИС) – гликопротеином, осуществляющим транспорт йода через клеточную мембрану за счет электрохимического градиента, образуемого Na^+/K^+ АТФазой [3, 4]. Неблагоприятные факторы окружающей среды могут подавлять экспрессию фолликулярными тироцитами мембранного гликопротеина НИС, обеспечивающего йодаккумуляционную функцию щитовидной железы [5]. Несмотря на многочисленные исследования синтеза и секреции гормонов щитовидной железы, ее регуляция эндогенными и экзогенными факторами еще предстоит изучить. Одним из способов такой регуляции является изменение баланса стабильных изотопов водорода во внутренней среде организма. В целом роль стабильных изотопов основных биогенных элементов до сих пор мало изучена и представляет собой перспективное направление биофизических, биохимических, молекулярных, генетических и других исследований. Известно, что водород имеет два стабильных изотопа: дейтерий и протий. Несмотря на то, что содержание дейтерия в живых организмах достаточно велико [6,7], его роль в метаболизме до конца не изучена. Показано, что сдвиги баланса дейтерия/протия провоцируют метаболические изменения, влияют на пролиферацию клеток и апоптоз [8–11]. Сдвиги в содержании дейтерия в организме влияют на метаболические процессы и изменяют физиологию органов [10], а поскольку все метаболические реакции регулируются гормонами, то они могут быть результатом воздействия дейтериевых сдвигов в метаболических реакциях клеток, а также изменения физиологии эндокринных желез. Изменение содержания дейтерия в организме легко достигается простым и безопасным методом – путем замены питьевой воды на обогащенную или обедненную по дейтерию воду [12], что вызывает большой интерес со стороны исследователей и врачей, так как это даёт возможность использовать регуляцию содержания дейтерия в качестве инструмента для проведения различной терапии. Цель настоящего исследования – выявить изменения в йодаккумуляционной функции щитовидной железы и её секреторных процессах при повышении содержания дейтерия в организме.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар. Контрольная группа ($n = 10$) употребляла дистиллированную водопроводную воду с нормальным содержанием дейтерия (146 ppm). Экспериментальная группа ($n = 10$) потребляла обогащенную дейтерием воду с $[\text{D}] = 500\,000$ ppm (ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия) *ad libitum* вместо водопроводной воды. Забор венозной крови и измерение веса проводили под золотильным наркозом в 10–11 часов утра накануне эксперимента, а также в 1, 3, 7, 14 и 21 дни. После инкубации при комнатной температуре ткани крови отделяли и собирали сыворотку. Общее изменение массы тела подсчитывали на 21-е сутки. Объем потребляемой воды измеряли ежедневно в 1-й и 3-й сроки, затем каждые 3 дня в 7-й, 14-й и 21-й сроки. Рассчитывали количество потребляемой воды на 1 кг массы тела. Концентрацию общего тироксина (Т4), общий трийодтиронина (Т3), (Cusabio, Китай), тиреотропного гормона (ТТГ) (BioVendor, Чехия) и НИС (тест Fine, Китай) в сыворотке крови измеряли методом иммуноферментного анализа по протоколам производителя с использованием микропланшет-ридера «Anthos 2010» при длине волны 450 нм. Все образцы были измерены в двух экземплярах. Статистический анализ проводился с использованием программного пакета «Statistica 7.0» (StatSoft, Талса, Оклахома, США). Нормальность распределения была подтверждена критерием Шапиро-Уилка. Центральная тенденция и дисперсия количественных признаков с примерно нормальным распределением были представлены как среднее и стандартное отклонение ($M \pm \text{SEM}$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Поскольку в исследование были включены молодые крысы постпубертатного возраста, в конце эксперимента наблюдался физиологический прирост массы тела. У крыс контрольной группы к 21-му дню наблюдалось увеличение массы тела на 38 %. У крыс, потреблявших обогащенную дейтерием воду, наблюдалось увеличение массы тела всего на 9,7 %, а их масса на 21-й день эксперимента была значительно ниже, чем в контрольной группе. Потребление крысами обогащенной дейтерием воды было несколько ниже, чем в контроле, но различия были статистически недостоверны.

Суммарные концентрации ТЗ, Т4 и тиреотропного гормона измеряли за день до воздействия (день 0). Достоверных различий между группами не обнаружено (рис. 1а, б; рис. 2). Через сутки у крыс, потреблявших воду, обогащенную дейтерием, уровень Т4 был повышен, а ТЗ незначительно снижен. ТТГ также был снижен по сравнению с контролем (рис. 3). На 3-и сутки эксперимента отмечалось увеличение продукции Т4 и ТЗ. Их концентрации значительно превышали значения контрольной группы (рис. 1а, б; рис. 2). Уровень ТТГ хотя и повысился, но всё же был ниже, чем в контрольной группе (рис. 3).

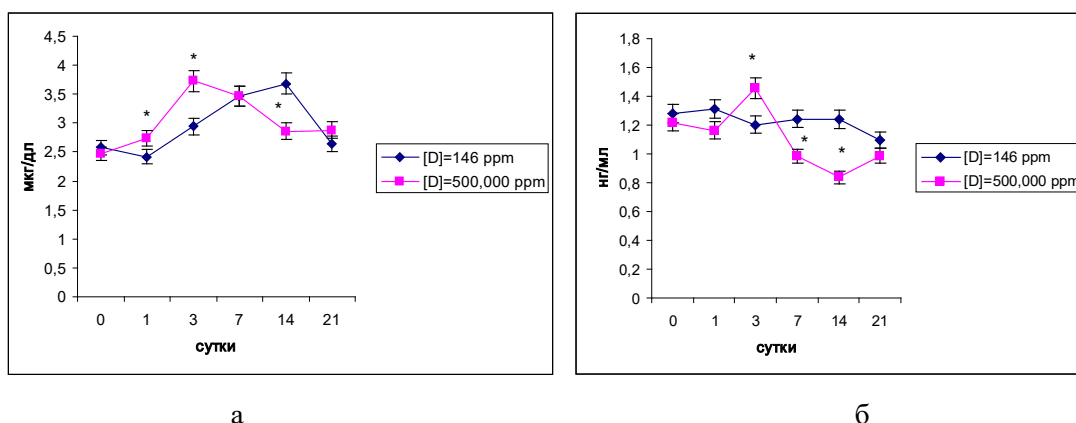


Рис. 1. Гормональный профиль щитовидной железы крыс, потреблявших воду с модифицированным содержанием дейтерия в течение 21 дня. а – концентрации Т4 в сыворотке; б – концентрации ТЗ в сыворотке; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

На 7-и сутки у крыс, опытной группы, концентрация Т4 не отличалась от контрольных значений. Наблюдалось достоверное снижение концентрации ТЗ (рис. 1а, б). Уровень ТТГ также был ниже контрольных значений (рис. 2). На 14-е сутки эксперимента у крыс, потреблявших обогащенную дейтерием воду, наблюдалось достоверное снижение концентрации всех гормонов щитовидной железы (рис. 1а, б; рис. 2). Содержание ТТГ в сыворотке крови было в три раза ниже контрольных значений (рис. 3). На 21-е сутки эксперимента у крыс, потреблявших обогащенную дейтерием воду, отмечено восстановление секреции гормонов щитовидной железы. Концентрация Т4 соответствовала контрольным значениям, а уровень ТЗ был незначительно ниже, чем в контроле (рис. 1а, б; рис. 2). Уровень ТТГ был значительно снижен (рис. 3).

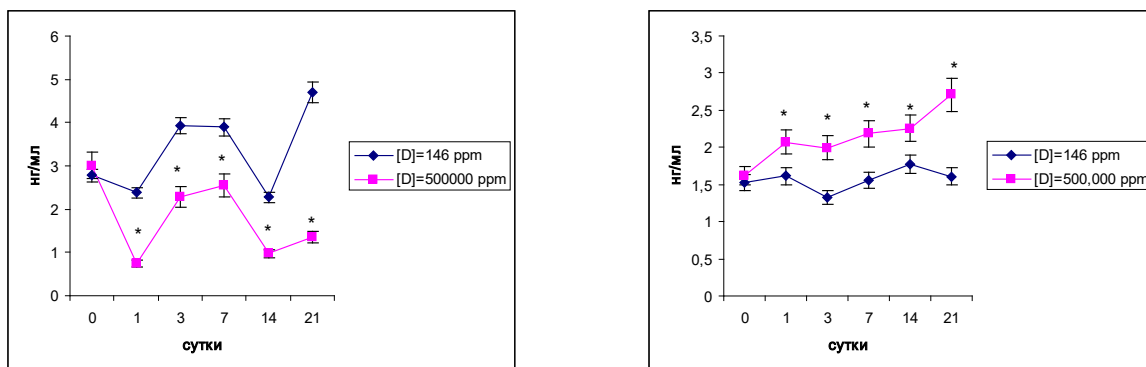


Рис. 2. Концентрация тиреотропного гормона у крыс, потреблявших воду с модифицированным содержанием дейтерия в течение 21 дня; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рис. 3. Концентрация НИС в сыворотке крови у крыс, потреблявших воду с модифицированным содержанием дейтерия в течение 21 дня; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Оценка уровней НИС в сыворотке крови уже через сутки потребления тяжелой воды выявила значительное повышение уровня у крыс опытной группы. В дальнейшем уровень НИС продолжал неуклонно расти и к 21-ым суткам был на 60 % выше исходных значений.

Обсуждение. Известно, что функция щитовидной железы зависит от поступления йода. Транспорт иодида из кровотока в цитоплазму посредством НИС является первым этапом синтеза тиреоидных гормонов [13]. Далее йодид транспортируется через апикальную мембрану с помощью пендрина и других белков в коллоид [14]. Затем йодид окисляется тиреопероксидазой которая также присоединяет йодид к тирозильным остаткам тиреоглобулина с образованием Т3 и Т4, которые хранятся в коллоиде, ковалентно связанном с тиреоглобулином. Снижение уровня NIS в крови обычно связано со снижением продукции гормонов щитовидной железы, а восстановление экспрессии NIS положительно влияет на активность щитовидной железы [15]. Существует несколько способов стимуляции НИС. Так для достижения увеличения поглощения радиоiodида достаточного для терапии рака щитовидной железы используется ТТГ, а при раке молочной железы мощным индуктором НИС является ретиноевая кислота [16]. В настоящем исследовании мы обнаружили стимулирующее влияние повышения содержания дейтерия в организме на продукцию тиреоидных гормонов. Однако затем у крыс наступало кратковременное снижение активности гипофиза, что приводило к значительному уменьшению синтеза гормонов щитовидной железой. На третьей неделе эксперимента функционирование гипофизарно-тиреоидной оси восстанавливалось. Оценивая уровни NIS в сыворотке мы обнаружили связь с изменениями концентрации гормонов щитовидной железы в течение трех первых суток и отсутствие таковой в дальнейшем. Более того, NIS не коррелировал с ТТГ, основным положительным регулятором экспрессии NIS [17].

Длительное употребление воды, обогащенной дейтерием, вызывало постепенное повышение уровня НИС в сыворотке крови. Это могло быть связано с изменением транспортной активности йодидного канала. Известно, что NIS транспортирует йодид с помощью электрохимического градиента, генерируемого Na, K-АТФазой [18, 19, 13]. Ранее было показано, что дейтерирование клеток замедляет скорость переносчиков ионов, ингибирует активность АТФ-синтазы и снижает продукцию АТФ [20]. Таким образом, повышение уровня НИС у крыс, потребляющих воду, обогащенную дейтерием, можно рассматривать как компенсаторный процесс и отражать изменения, вызванные градиентом крови / тканей и энергетически связанным снижением эффективности НИС. Однако эта гипотеза указывает на наличие нового неизвестного механизма регуляции синтеза НИС, который требует дальнейших исследований.

Заключение. На основании полученных данных можно рассматривать повышение содержания дейтерия в организме как способ повышения йодаккумулялирующей функции щитовидной железы.

Исследование выполнено по госзаданию FGFZ-2022-0035.

Литература

1. Zoeller RT et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the endocrine society. *Endocrinology*. 2012; 153(9) : 4097–4110. DOI: 10.1210/en.2012-1422.
2. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015; 3(4) : 286–295. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
3. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*. 1993; 1154(1) : 65–82. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90017-I.
4. Darrouzet E, et al. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014; 1838(1) : 244–253. DOI: 10.1016/j.bbamem. 2013.08.013.
5. Обернихин СС, и др. Изменения продукции мембранных белков, обеспечивающих йодаккумулялирующую функцию щитовидной железы, при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020; 3:3–12.
6. Podlesak, D.W.; Torregrossa, A. – M.; Ehleringer, J.R.; Dearing, M.D.; Passey, B.H.; Cerling, T.E. Turnover of oxygen and hydrogen isotopes in the body water, CO₂, hair, and enamel of a small mammal. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2008, 72, 19–35.
7. Somlyai, G.; Javaheri, B.; Davari, H.; Gyöngyi, Z.; Somlyai, I.; Tamaddon, K.A.; Boros, L.G. Pre-Clinical and Clinical Data Confirm the Anticancer Effect of Deuterium Depletion. *Biomacromol. J.* 2016, 2, 1–7.
8. Boros, L.G.; Somlyai, I.; Kovács, B.Z.; Puskás, L.G.; Nagy, L.I.; Dux, L.; Farkas, G.; Somlyai, G. Deuterium Depletion Inhibits Cell Proliferation, RNA and Nuclear Membrane Turnover to Enhance Survival in Pancreatic Cancer. *Cancer Control* 2021, 28, 1–12.
9. Zhang, X.; Wang, J.; Zubarev, R.A. Slight Deuterium Enrichment in Water Acts as an Antioxidant: Is Deuterium a Cell Growth Regulator? *Mol. Cell. Proteom.* 2020, 19, 1790–1804.
10. Kravtsov, A. et al. Reduction of Deuterium Level Supports Resistance of Neurons to Glucose Deprivation and Hypoxia: Study in Cultures of Neurons and on Animals. *Molecules* 2022, 27, 243.

11. Yaglova, N.V.; Timokhina, E.P.; Obernikhin, S.S.; Yaglov, V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3107.
12. Dzhimak, S.S.; Basov, A.A.; Baryshev, M.G. Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015, 465, 370–373.
13. Portulano, C.; Paroder-Belenitsky, M.; Carrasco, N. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact. *Endocr. Rev.* 2014, 35, 106–149.
14. De la Vieja A & Santisteban P 2018 Role of iodide metabolism in physiology and cancer. *Endocrine-Related Cancer* 25 R225-R245. (<https://doi.org/10.1530/ERC-17-0515>)
15. Yaglova, N.V.; Yaglov, V.V. Mechanisms of Disruptive Action of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the Function of Thyroid Follicular Epitheliocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015, 160, 231–233.
16. Kogai T, Brent GA. The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2012 Sep; 135(3) : 355–70. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.06.007.
17. Pesce, L.; Kopp, P. Iodide transport: Implications for health and disease. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* 2014, 2014, 8.
18. Carrasco, N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1154, 65–82.
19. Dohan, O.; De la Vieja, A.; Paroder, V.; Riedel, C.; Artani, M.; Reed, M.; Ginter, C.S.; Carrasco, N. The sodium/iodide Symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 2003, 24, 48–77.
20. Olgun, A. Biological effects of deuteration: ATP synthase as an example. *Theor. Biol. Med. Model.* 2007, 22, 4–9.

УДК 574.24

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-2-13>

ИЗУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И ЕЁ ПРОИЗВОДНЫХ НОВЫМ ШТАММОМ *PENICILLIUM SP. I22.*

И.С. Климашов¹, Л.Б. Глухова^{1,2}, Д.А. Ивасенко^{1,2}

¹ Томский государственный университет, Томск, Россия

² ООО «Дарвин», Томск, Россия

Разливы и загрязнение углеводородами остается актуальной проблемой и по сей день (Kumar et al., 2023; Hkiri et al., 2023, Позднякова и др., 2019). Биологические методы очистки от нефтезагрязнений остаются самыми безопасными по сравнению с химическими методами, но требуют времени. Для биологической очистки от полициклических ароматических углеводородов нефти традиционно применяют биопрепараты на основе бактерий родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium* и др. (Homenko & Nogina, 2015). Тем не менее, ограничительным фактором применения биологических препаратов может выступать состав нефти (Бухарина и др., 2022). Показано, что грибы, обладая мощным и богатым ферментативным комплексом, также способны к процессам нефтедеструкции (Позднякова и др., 2019; Бухарина и др., 2022; Kumar et al., 2023; Hkiri et al., 2023). Этим свойством обладают как аскомицеты, так и базидиомицеты, превосходя, по некоторым показателям бактерии (Позднякова и др., 2019). Таким образом, поиск, изучение и оценка биодegradационного потенциала новых штаммов нефтеразрушающих микромицетов остается актуальным. Ранее из загрязненных нефтяными разливами почв севера Томской области выделен в чистую культуру изолят *Penicillium sp. I22*. Определение видовой принадлежности штамма по трем локусам: регион ITS1–5.8S–ITS2, и частичным последовательностям генов кальмодулина и β-тубулина показало, что изолят относится к виду *Penicillium citrinum*. Штамм обладал эмульгирующей активностью, которая варьировала в диапазоне 48–74 % на 3, 6, 10 и 12 сутки. Степень деградации алканов для изолята *Penicillium sp. I22* составила 98 % на минеральной питательной среде (30 сутки). Таким образом, полученный штамм *Penicillium citrinum sp. I22* обладает потенциалом для использования в процессах ремедиации при разливах нефти.

Литература

- Бухарина И.Л., и др., 2022, Перспективы использования консорциумов микроорганизмов и высших растений в восстановлении нефтезагрязненных земель // Лесной вестник, Т. 26, № 6, С. 14–23. DOI: 10.18698/2542-1468-2022-6-14-23
- Позднякова Н.Н., и др. 2019, Деградационная активность грибов по отношению к углеводородам нефти в условиях повышенной температуры // Теоретическая и прикладная экология, № 4, С. 69–75. DOI: 10.25750/1995-4301-2019-4-069-075
- Хоменко Л.А., Ногина Т.М., 2015, Микробная деструкция минеральных (нефтяных) масел // Микробиол. журн., 2015, Т 77, № 6. DOI: 10.15407/microbiolj77.06.070
- Kumar V., et al., 2023, Studies on the morphology, phylogeny, and bioremediation potential of *Penicillium citrinum* and *Paecilomyces variotii* (Eurotiales) from oil-contaminated areas // Archives of Microbiology V.205, № 50.
- Hkiri N., et al. 2023, Ability of marine-derived fungi isolated from polluted saline environment for enzymatic hydrocarbon remediation // Brazilian Journal of Microbiology, V. 54, P. 1983–2000. DOI: 10.1007/s42770-023-01049-4

ИЗУЧЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЛАВНОГО АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ БЕРЁЗЫ Bet v 1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК РЕСПИРАТОРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЛИНИИ CALU-3 И ПЕРВИЧНЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова***Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Аллергия является глобальной проблемой всемирного здравоохранения. Число людей, страдающих различными аллергическими заболеваниями, стремительно растет с каждым годом и, по мнению экспертов, к 2050 году может достигнуть отметки в 4 млрд человек. Выявление причин и механизмов развития сенсibilизации является необходимым этапом на пути создания новых эффективных средств для лечения аллергии. Известно, что в ходе сенсibilизации иммунной системы к аллергену ключевым этапом является образование в организме противовоспалительных хелперных Т-лимфоцитов (Th2-клеток), а направление дифференциации Т-лимфоцитов во многом определяется цитокиновым окружением в момент презентации антигена антигенпрезентирующими клетками.

В данной работе нами был исследован сенсibilизационный потенциал главного аллергена пыльцы берёзы Bet v 1 в системе совместного культивирования клеток респираторного эпителия Calu-3 и иммунных клеток, что имитировало проникновение аллергена в организм через эпителий респираторного тракта. Для этого исследования клетки линии Calu-3 выращивались на специальных вставках 24-луночного планшета в течение нескольких недель до достижения состояния поляризованного монослоя. Иммунные клетки, использованные в данной работе, были выделены от пациента, страдающего аллергическими реакциями на пыльцу берёзы и имеющего в сыворотке специфические антитела к Bet v 1, а также от контрольного здорового донора. Врождённые лимфоидные клетки 2 типа (ILC2) и хелперные Т-лимфоциты (Th) выделялись из фракции мононуклеарных клеток периферической крови методом магнитно-активированной сортировки клеток с использованием коммерческих наборов фирмы Miltenyi Biotec, а дендритные клетки (moDC) были выращены из первичных моноцитов путем добавления в питательную среду 500 МЕ/мл IL-4 и 800 МЕ/мл GM-CSF. Сначала в системе ILC2/Calu-3 моделировали проникновение аллергена Bet v 1 через респираторный барьер и ответ врождённых лимфоидных клеток 2 типа, а затем вставки с монослоем Calu-3 через 24 часа переносили во второй планшет со смесью дендритных клеток и хелперных Т-лимфоцитов (система moDC + Th/Calu-3), в котором моделировали презентацию аллергена дендритными клетками хелперным Т-лимфоцитам, и оставляли ещё на 48 часов. Концентрации 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста клеток на белковом уровне в образцах питательной среды были определены методом мультиплексной технологии на магнитных частицах xMAP с использованием набора MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A kit (кат. № HCYTA-60K-PX48, Merck).

В случае иммунных клеток, выделенных от донора с аллергией на пыльцу берёзы, было показано снижение уровней продукции ряда провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как CCL7, IL-2, IFN γ , и повышение уровней противовоспалительного IL-1RA. Нами было высказано предположение, что при проникновении главного аллергена пыльцы берёзы Bet v 1 в организм через респираторный эпителиальный барьер этого может оказаться достаточно для того, чтобы появились противовоспалительные Th2-клетки, специфичные к Bet v 1. Полученные нами данные позволили также предположить, что взаимодействие между эпителиальными и иммунными клетками (ILC2, DC и Th-клетки) может играть решающую роль в развитии сенсibilизации иммунной системы к главному аллергену пыльцы берёзы Bet v 1.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-75-10116).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОСНОВНОГО АЛЛЕРГЕНА ПЫЛЬЦЫ ОЛЬХИ
ALN G 1 С ЭПИТЕЛИЕМ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ*****А.Е. Потапов, Д.Н. Мельникова, Т.В. Овчинникова, И.В. Богданов****Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Аллергические заболевания в настоящее время представляют собой значительную проблему здравоохранения, с прогнозируемым увеличением распространенности до 50 % мирового населения к 2050 году. Распространение аллергенов, как пищевых, так и аэроаллергенов (например, пыльцы), играет ключевую роль в этой тенденции. Гомология между аллергенами может вызывать перекрестную реакцию IgE у пациентов, что делает сенсibilизацию к одному аллергену потенциально опасной в отношении развития реакций на структурно схожие молекулы.

Гомологи Bet v 1 являются одной из наиболее значимых групп аллергенов, вызывающих весенний поллиноз. В настоящее время единственным этиотропным методом лечения аллергии является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ). Однако АСИТ имеет ряд недостатков, включая длительность курса и риск развития побочных реакций, связанных с введением аллергена в организм с постепенным увеличением дозы. Разработка гипоаллергенных вариантов белков представляет собой перспективное решение для снижения риска побочных реакций при проведении АСИТ. Тем не менее, механизм возникновения аллергии на белки, способные переносить липиды, остается неясным. Понимание этого механизма является ключевым фактором для выбора оптимального метода лечения и разработки новых молекул для АСИТ. Цель нашего исследования – изучить взаимодействие аллергенов с эпителиальными клетками человека с целью расшифровки механизмов развития аллергии и создания основы для разработки новых молекул для АСИТ.

В рамках данной работы были разработаны способы получения Aln g 1 и его мутанта D27A/L30A с менее аллергенными свойствами с использованием экспрессионного вектора pET-His8- и клеток *E. coli* BL21(DE3). Очистка рекомбинантных белков включала их выделение из нерастворимых фракций клеточного белка, металлохелатную хроматографию, диализ и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Гомогенность полученного Aln g 1 и D27A/L30A была подтверждена с использованием методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и SDS-электрофореза в ПААГ.

Для исследования способности Aln g 1 влиять на эпителиальные клетки респираторного эпителия Calu-3 использовался метод ПЦР в реальном времени. В качестве референсных генов использовались GAPDH и актин-γ, так как они являются наиболее стабильно экспрессируемыми в эпителиальных клетках. Анализ производился методом ΔΔC_q, и в результате было показано, что Aln g 1 способен индуцировать экспрессию генов про- и противовоспалительных цитокинов (IL-33, TSLP, IL-1β, IL-13, IL-8), оказывающих влияние на формирование иммунного ответа человека. При этом механизм, описывающий данное взаимодействие, остается неясен. Вероятно, он схож с ранее описанным для протеазных аллергенов, разрушающих целостность эпителия и индуцирующих продукцию цитокинов путем активации рецепторов, например, с TLR-4 или/и PAR-2. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что Aln g 1 способен вызывать сенсibilизацию иммунной системы.

В контексте предполагаемого механизма взаимодействия аллергена ольхи с эпителиальными клетками было исследовано взаимодействие Aln g 1 и его мутанта D27A/L30A с цвиттерионными POPC и отрицательно заряженными POPG липосомами, загруженными кальцеином. Было показано, что Aln g 1 и D27A/L30A способны разрушать оба вида липосом, но в разных молярных концентрациях. Для POPC липосом было показано, что D27A/L30A эффективнее разрушает липосомы, чем нативный белок, однако полной пермеабиллизации не происходит даже при его высоких концентрациях (10 мМ). Вследствие проведения замен аминокислотных остатков вышесказанное может быть обусловлено частичным изменением конформации одного из участков белка, взаимодействующего с мембраной. В случае POPG липосом оба белка разрушают их с одинаковой эффективностью. Однако, концентрация белков, при которой начинается процесс пермеабиллизации, в 4 раз ниже, чем при разрушении POPC липосом.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что Aln g 1 способен взаимодействовать с мембраной клеток, поскольку даже в наномолярных концентрациях нарушает целостность отрицательно заряженных POPG липосом, а также может взаимодействовать с POPC липосомами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-75-10116)

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНАЛОГА АС-AMP2 ИЗ АМАРАНТА**А.А. Герасимова^{1,2}, Емельянова Э.М.³, И.В. Богданов², Е.И. Финкина², Т.В. Овчинникова^{1,2,3}**¹ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Последнее время грибковые заболевания представляют собой серьезную клиническую проблему. Наиболее опасные микозы по данным ВОЗ вызывают грибы родов *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* и *Pneumocystis*. Обострение ситуации вызвано ограниченностью списка конвенциональных антимикотиков и распространением резистентных штаммов грибов. В связи с этим, поиск новых соединений с противогрибковой активностью является крайне актуальной задачей. В роли таких соединений могут быть рассмотрены пептиды врожденного иммунитета растений, в частности гевеинподобные пептиды. Они имеют стабилизированную дисульфидными связями структуру и проявляют выраженную противогрибковую активность в отношении различных фитопатогенов. Одним из таких пептидов является Ас-AMP2 из семян амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus*.

Известно, что гевеинподобные пептиды связывают хитин, являющийся компонентом клеточной стенки грибов. В данной работе мы разработали биотехнологический способ получения модифицированного аналога Ас-AMP2, обладающего большим сродством к хитину, и исследовали его активность в отношении патогенных для человека дрожжеподобных грибов. Рекомбинантный пептид был получен путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Фрагменты ДНК, кодирующие модифицированный Ас-AMP2 M13A/F18W, получали методом синтеза de novo с помощью ПЦР. Методом безлигазного клонирования синтезированный фрагмент был введен в вектор рЕТ, кодирующий белок-носитель тиоредоксин А и октагистидиновую последовательность под контролем промотора Т7. Правильность сборки генетической конструкции была подтверждена секвенированием. Для проведения экспрессии клетки *E. coli* штамма BL21 трансформировали полученной плазмидой рЕТ-His8-TrxL-Ас-AMP2 M13A/F18W и выращивали на богатой питательной среде с 20 мМ глюкозой и 100 мкг/мл ампициллином при 30 °С. Для индукции экспрессии использовали 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид. Очистку рекомбинантного пептида проводили из растворимой фракции клеточного белка, используя металлохелатную хроматографию, расщепление гибридного белка бромцианом по искусственно введенному остатку метионина и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Высокое качество препарата рекомбинантного пептида было подтверждено методами SDS-электрофореза в ПААГ, MALDI-TOF масс-спектрометрии и КД-спектроскопии.

Противогрибковую активность модифицированного Ас-AMP2 исследовали в 96-ти луночных планшетах в отношении ряда чувствительных и резистентных к производным триазола штаммов *Candida albicans* (ATCC 18804, ATCC 10231, клинические изоляты 9.1 и 8.2). Модифицированный Ас-AMP2 был активен в отношении всех исследуемых штаммов, причем минимальные ингибирующие концентрации (МИК) составляли всего 0,39 или 0,78 мкМ. Микроскопический анализ выявил, что в более высоких концентрациях Ас-AMP2 M13A/F18W вызывал лизис клеток грибов. Высев содержимого лунок с пептидом в концентрациях, равных МИК и выше, выявил, что модифицированный Ас-AMP2 действовал фунгицидно в отношении чувствительного штамма ATCC 18804 и фунгистатически в отношении остальных резистентных штаммов *C. albicans*. Присутствие в ростовой среде солей или компонентов сыворотки приводило к повышению МИК модифицированного пептида, однако его противогрибковая активность все равно была довольно выраженной. Полученный пептид не обладал гемолитической активностью и не проявлял цитотоксические свойства в отношении мононуклеарных клеток периферической крови в концентрации 25 мкМ.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00380).

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ФЕНОЛОКСИДАЗ АЗОСПИРИЛЛ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕСТРУКЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

М.А. Купряшина, Е.Г. Пономарева

ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Россия, г. Саратов

Ферменты способные к окислению широкого спектра ароматических соединений, таких как полифенолы, ароматические амины, дифенолы объединены в группу фенолоксидаз [1]. Наиболее важной с точки зрения биотехнологического применения является способность данных ферментов к деструкции лигнинов, синтетических красителей и других органополифенолов [2]. Как правило это гем- и медьсодержащие оксидазы и оксидоредуктазы, такие как Mn-пероксидаза, лакказы, диоксигеназа и ДуР-пероксидаза. На сегодняшний день пул фенолоксидаз обнаружен и у бактерий [3]. Ранее нами показана способность бактерии рода *Azospirillum* к продукции фенолоксилирующих ферментов и окислению таких соединений как 2,6-диметоксифенол, L-дигидроксифенилаланин, 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (ABTS), модельных препаратов лигнина и синтетических красителей.

Цель работы – поиск с использованием методов биоинформатики генов-кандидатов ферментов фенолоксидазного комплекса бактерий рода *Azospirillum*, конструирование праймеров, комплементарных фрагментам обнаруженных генов и характеристика с использованием ПЦР-анализа обратных транскриптов в реальном времени их профилей экспрессии при культивировании азоспирилл в присутствии фенольных соединений. В качестве модельных соединений использовали 2,6-диметоксифенол и гваякол – это органические соединения, принадлежащее к классу фенолов, которые нашли широкое применение в различных отраслях промышленности, включая пищевую и фармацевтическую.

Поиск аминокислотных последовательностей ферментов фенолоксидазного комплекса бактерий рода *Azospirillum* осуществляли в базах данных Protein NCBI, UniProt, PeroxiBase. Сравнение аминокислотных последовательностей белков проводили с помощью инструмента Protein BLAST (Basic Local Alignment Tool, или BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Параметры поиска: база данных – non-redundant protein sequences, организм – *Azospirillum* (taxid : 191), алгоритм blastp (protein-protein BLAST). Поиск гомологии соответствующих последовательностей нуклеотидов проводили с использованием программ BLASTn. Изучаемая аминокислотная последовательность сравнивалась с транслированными последовательностями базы данных секвенированных нуклеиновых кислот с использованием алгоритма tblastn. Для конструирования праймеров использовали пакет программ Vector NTI версия 10 («Invitrogen», США) и нуклеотидные последовательности, опубликованные во всемирной базе данных (NCBI GenBank). Количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией с флуориметрической регистрацией результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на базе научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского. Выделение РНК азоспирилл осуществляли колоночным методом с использованием коммерческого набора RuPlus («Биолабмикс, Россия»). Осадок бактерий получали из культуральной среды, содержащей 1 мМ модельных соединений. О начале процесса деструкции веществ судили по изменению окраски культуральной среды. Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью двухстадийной ОТ-ПЦР-РВ путем амплификации фрагментов гена-мишени и гена recA (recA-fw GTCGAACTGCCTGGTGATCT, recA-rv GACGGAGGCGTAGAACTTCA), выбранного в качестве референсного гена, на матрицах кДНК. Реакцию обратной транскрипции и постановку ПЦР-РВ проводили с использованием наборов реагентов «Биолабмикс, Россия». Амплификацию проводили с использованием прибора для ПЦР в режиме реального времени LightCycler 96 («Roche», Швейцария). Синтез праймеров осуществляли методом фосфорамидитной химии на автоматическом олигосинтезаторе Polygen 12 («Polygen», Германия). Анализ данных ПЦР и определение уровней генов фенолоксидаз проводили методом $\Delta\Delta C_t$ на сертифицированном программном обеспечении LightCycler® 96 Software, версия 1.1.0.1320. Опыты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Для статистической обработки полученных данных использовали статистический пакет анализа данных программы Microsoft Office Excel.

Нами был проведен анализ *in silico* по алгоритму, опирающемуся на сравнении аминокислотных последовательностей предполагаемых ферментов-гомологов фенолоксидаз. Нам удалось идентифицировать у бактерий рода *Azospirillum* несколько аннотированных последовательностей белков – гомологов пероксидаз, диоксигеназ, лакказоподобных оксидаз. На основе полученных данных был осуществлен подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров, комплементарных фрагментам генов фенолоксидаз (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры к генам фенолоксидаз азоспирилл

Фермент	Праймеры (fw-прямой, rv-обратный)	Последовательность 5' – 3'
Дур-пероксидаза	DyP-fw	TCTGCCTCAACACGGACATC
	DyP-rv	CGTGGACGTGGAAACCTACA
Каталаза/пероксидаза HPI	CatPer-fw	ACGCTGACGAACGACTTCTT
	CatPer-rv	GCCTGGACGAAGGTGATGAA
Лакказа	Lcc-fw	GCAACACCGTCACCATCAAC
	Lcc-rv	TCTGTATCGACATGGAAGGC
Катехол-1,2-диоксигеназа	Dyox-fw	TTCATGAACAGGGGCTCACC
	Dyox-rv	CAGGAAGTGGTCGAAACCGA

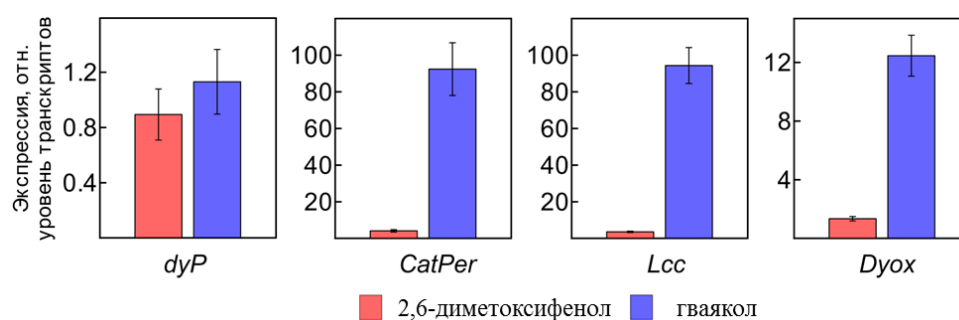


Рис. 1. Анализ транскрипционной активности генов фенолоксилирующих ферментов

Далее мы исследовали отклик ферментативной системы азоспирилл в процессе окисления 2,6 – диметоксифенола и гваякола. Был проанализирован уровень относительной экспрессии генов четырех фенолоксилирующих ферментов азоспирилл (рисунок 1). Анализ транскрипционной активности показал, что выбранные для исследования гены фенолоксидаз экспрессируются в различной степени в условиях культивирования бактерии в присутствии фенольных соединений. Наибольший отклик ферментативной системы азоспирилл наблюдался в отношении гваякола.

Мы предполагали, что катехол – 1,2-диоксигеназа (пирокатехаза) может играть ключевую роль в процессах деструкции фенольных соединений азоспириллой. Именно этот фермент описан у бактерий, проявляющих лигнинолитическую активность, как катализатор реакций деструкции ароматических соединений [4]. Однако наиболее выраженный эффект от присутствия модельных соединений фенола отмечался на уровне транскриптов генов CatPer и Lcc, кодирующих каталазу/пероксидазу HPI и лакказу, соответственно. Экспрессия CatPer и Lcc была намного выше по сравнению с другими исследуемыми генами фенолоксидаз, в том числе в разы превосходила экспрессию генов Dyox (катехол-1,2-диоксигеназа). По данным литературы для бактериальных DyP-пероксидаз показана лигнин-пероксидазная и Mn-пероксидазная активность, аналогичная ферментам грибов, участвующим в окислении синтетических красителей и других органоуполлютантов [5]. Наименьшее значение относительного уровня транскриптов при культивировании *A. brasilense* SR80 в присутствии гваякола и 2,6-диметоксифенола отмечался для гена DyP-пероксидазы.

Таким образом, проведен биоинформатический анализ последовательностей потенциальных целевых генов ферментов фенолоксидазного комплекса *A. brasilense*. Сконструированы праймеры, комплементарные фрагментам генов Дур-пероксидазы, каталазы/пероксидазы HPI, лакказы, катехол-1,2-диоксигеназы. В ходе проведенного исследования изучено изменение транскрипционной активности генов азоспирилл, кодирующих синтез фенолоксилирующих ферментов, при культивировании в присутствии модельных фенольных соединений. С использованием ПЦР-анализа обратных транскриптов в реальном времени получены данные о статистически значимом увеличении уровней экспрессии генов каталазы-пероксидазы HPI (CatPer), лакказы (Lcc), катехол-1,2-диоксигеназы (Dyox) *A. brasilense* SR80 в данных условиях. Наибольшие значения экспрессии генов-предшественников ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл, нормированных относительно гена рекомбиназы азоспириллы *recA*, зарегистрированы в присутствии гваякола.

Полученные результаты являются важными в установлении роли фенолоксидаз азоспирилл в процессах деструкции ароматических соединений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00570.

Литература

1. Sinsabaugh R.L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil // Soil Biol. Biochem. – 2010. – Vol. 42. – P. 391–404.
2. Routoula E., Patwardhan S.V. Degradation of anthraquinone dyes from effluents: a review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential // Environ. Sci. Technol. – 2020. – Vol.54, No. 2. – P. 647–664.
3. Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколоризации синтетических красителей // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 4. – С. 453–461.
4. Krastanov A., Alexieva Z., Yemendzhiev H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives // Eng. Life Sci. – 2013. – Vol. 13, No. 1. – P. 76–87.
5. Casciello C., Tonina F., Berinia F., Fasolic E., Marinellia F., Pollegionia L., Rosini E. Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens* // Biotechnol. Rep. – 2017. – Vol. 13. – P. 49–57.

УДК 640

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-2-18>

МЕТАБОЛИЗМ КРАСНОГО ФОСФОРА В ФОСФАТ

А.З. Миндубаев¹, А.Р. Галимова⁴, Э.Л. Гоголашвили³, Э.В. Бабынин²

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия

² ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия

³ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», г. Казань, Россия

⁴ Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, г. Казань, Россия

Метод биодegradации широко применяется для ликвидации загрязнений токсичными поллютантами, очистки стоков, выбросов и отходов промышленных предприятий, химических и бытовых отходов. Однако, на сегодняшний день возможности биодegradации далеко не исчерпаны.

В более ранних исследованиях показана способность микроорганизмов, главным образом, грибов черных аспергиллов *Aspergillus niger* окислять до безвредных фосфат-ионов вещество первого класса опасности белый фосфор. Красный фосфор намного менее токсичен, но более термодинамически стабилен, и это затрудняет его ферментативный метаболизм. Тем не менее, более поздние исследования показали, что красный фосфор служит источником биогенного элемента для тех же самых грибов, которые обезвреживают белый фосфор.

Впрочем, описания экспериментов носили, в основном, качественный характер (рис. 1). Количественная оценка биодegradации имеет важнейшее значение, и в представленной работе показаны первые количественные данные по биодegradации красного фосфора *A. niger* F-4815D. Эти данные свидетельствуют о достоверном увеличении скорости окисления красного фосфора, выраженном через накопление фосфат-ионов – конечного продукта окисления, под воздействием метаболизма растущего в культуральной среде аспергилла. По сравнению с контролем – стерильной средой, содержащей красный фосфор, скорость возрастает в 1.25 раз [1]. Разница незначительная, но достоверная и проявляющаяся в каждом повторе эксперимента.



Рис. 1. Рост *Aspergillus niger* F-4815D в присутствии красного фосфора, 2 суток после посева

Можно предполагать, что эта разница была бы еще выше. Но исследуемый красный фосфор оказался изначально загрязненным фосфорной кислотой. Вероятно, окислялся в процессе хранения. Поскольку аспергилл изначально рос в среде, обогащенной фосфатами, активность процесса биодegradации красного фосфора была снижена по сравнению с теоретически возможной. Тем не менее, представленная работа – первое задокументированное исследование, подтверждающее биодegradацию красного фосфора.

Литература

1. Миндубаев А.З., и др. Биотрансформация красного фосфора в фосфаты при помощи *Aspergillus niger* // Вестник технологического университета. – 2023. – Т. 26. – № 10. – С. 41–45. DOI: 10.55421/1998-7072_2023_26_10_41

ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

П.С. Шинкевич, К.А. Вельможина, Н.В. Зибарев, Н.А. Политаева, А.М. Опарина

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Достижение целей углеродной нейтральности является приоритетом развития большинства развитых стран мира. Многочисленные прогнозы, представленные учеными из разных стран, указывают на необходимость сокращения углеродных выбросов [1–3]. Например, в одном исследовании предсказывается, что повышение уровня углекислого газа в атмосфере приведет к повышению средней температуры воздуха на планете до 6 °C [4]. Различают химические, физические и биологические методы улавливания углекислого газа из промышленных выбросов [5–8]. Один из подходов к контролю уровня CO₂ включает технологии улавливания и хранения углерода (CCS – carbon capture and storage) и технологии улавливания и утилизации углерода (CCU – carbon capture utilization). Хотя у этих технологий много общего, их основное различие заключается в подходе к углекислому газу [9, 10]. Технологии CCS рассматривают CO₂ как отходы, подлежащие утилизации, в то время как технологии CCU рассматривают CO₂ как ресурс для производства новых продуктов. В этом контексте технологии CCU являются более экологичной и энергоэффективной альтернативой. Эффективность и осуществимость этих технологий подтверждаются различными исследованиями. Согласно Данешвару Э. и соавторам (2022), наиболее актуальные технологии CCU на сегодняшний день включают преобразование CO₂ в химические вещества и топливо, а также биологическое преобразование CO₂ микроводорослями [11]. С экологической точки зрения биологические методы улавливания углекислого газа являются наиболее целесообразным направлением развития этих технологий. Методы биологической фиксации предполагают улавливание CO₂ в процессе метаболизма живых организмов [12, 13]. По мнению Глазуновой Д.М. и соавт. (2024), высокая эффективность этих методов достигается за счет отсутствия реагентов, которые могли бы вызвать вторичное загрязнение окружающей среды [12]. Научное сообщество считает биологическую фиксацию CO₂ микроводорослями перспективной технологией из-за ее высокой эффективности. Среднее содержание углерода в биомассе микроводорослей составляет 50 % по массе [14]. По разным данным, 100 тонн биомассы микроводорослей способны улавливать около 183 тонн CO₂ [15–18]. Основываясь на этих данных и учитывая, что мировое производство микроводорослей составляет около 20 000 тонн в год, можно получить около 36 000 тонн CO₂ [18].

Изучению микроводорослей как современного метода биологического улавливания углекислого газа посвящены многочисленные научные статьи, как в российских библиотеках научного цитирования, так и в мировых научно-исследовательских базах данных. Во многих из этих статей подчеркивается ряд преимуществ микроводорослей, включая отсутствие конкуренции за ценные сельскохозяйственные угодья и независимость от сезонных колебаний. Однако научное сообщество по-прежнему сомневается в целесообразности внедрения этих технологий. Опасения ученых связаны со значительными первоначальными капитальными затратами, необходимыми для реализации таких проектов. Поэтому существует необходимость в экономической оценке затрат и выгод, связанных с внедрением технологий улавливания углерода с использованием микроводорослей.

Очистку воздуха от CO₂ и культивирование биомассы проводят при непрерывной продувке воздухом с помощью барботирующего устройства при поверхностной освещенности в диапазоне от 2500 до 3000 Лк в лабораторных герметичных фотобиореакторах-биофильтрах вместимостью 100 л, оснащенных системой аэрирования, освещения, температурными датчиками, подачи углекислого газа, системой удаления суспензии биомассы микроводорослей. По сравнению с естественными источниками света искусственные источники могут создавать большую облученность, что способствует увеличению прироста биомассы.

Температура раствора суспензии поддерживается в диапазоне от 25 до 30 °C за счет терморегуляторов. Интенсивное барботирование газами с высоким содержанием CO₂ (15–39 %) суспензии микроводоросли *Chlorella* позволяет интенсифицировать процессы поглощения CO₂ биомассой микроводорослей. CO₂ из газовых выбросов является источником неорганического углерода, который микроводоросли трансформируют в органический углерод биомассы, что способствует размножению клеток микроводоросли *Chlorella* и поддерживает необходимую pH раствора в пределах от 6,0 до 9,0.

Суспензия микроводорослей представляет собой раствор микроводоросли в питательной среде (в качестве источника дополнительных питательных веществ рекомендуется добавлять сточные воды пищевой промышленности). Реализация этого метода проиллюстрирована на рисунке 1 [19].

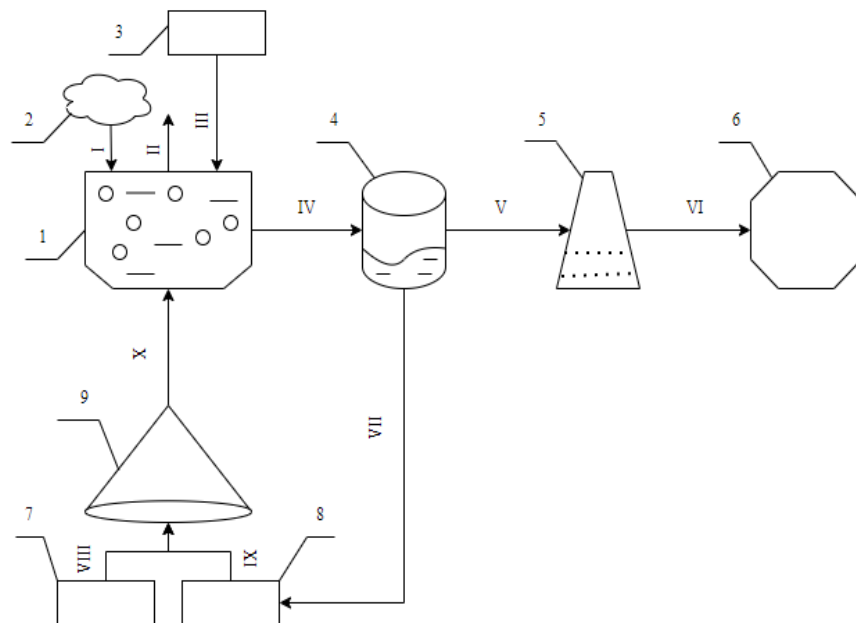


Рис. 1. Блок-схема способа очистки выбросов от углекислого газа микроводорослями *Chlorella*: где 1 – фотобиореактор-биофильтр, источник газов с повышенным содержанием CO_2 , 2 – источник газов с повышенным содержанием CO_2 , 3 – блок подачи маточной культуры, 4 – центрифугирование образовавшейся биомассы, 5 – гидрофильная сушка, 6 – сырье для получения биотоплива, 7 – блок подачи сточных вод, 8 – блок подачи питательной среды, 9 – блок смешивания питательной среды, сточных вод и остаточной культуры после центрифугирования, I – CO_2 , II – O_2 , III – маточная культура, IV – биомасса, V – биомасса после центрифугирования, VI – биомасса после сушки, VII – остаточная культура после центрифугирования, VIII – сточные воды, IX – питательная среда, X – смесь питательной среды, сточных вод и остаточной культуры после центрифугирования

Процесс утилизации CO_2 проводят в герметичных фотобиореакторах-биофильтрах объемом по 100 л каждый, в которых суспензию микроводоросли аэрируют на протяжении 648 часов (27 суток). Подача углекислого газа в фотобиореактор-биофильтр осуществлялся с помощью баллона CO_2 (имитация газовых выбросов энергоустановок) через аэрационную трубу, расположенную на дне фотобиореактора-биофильтра с отверстиями. Подача маточной культуры осуществляется вместе с питательной средой (в дальнейшем предполагается использование сточных вод предприятий пищевой промышленности в качестве источника дополнительных питательных компонентов).

По истечению 648 часов (27 суток) слив биомассы проводится с помощью крана. Для отделения осадка от раствора и сгущения биомассы применяется механическая обработка (центрифугирование). Полученная биомасса может быть использована в качестве сырья для получения продуктов с добавленной стоимостью, таких как биодизель, удобрения, корм и др., а надосадочная жидкость возвращается в фотобиореактор-биофильтр и может использоваться как одна из составляющих частей для новой питательной среды в усреднителе.

Для применения разработанного способа ($U_{\text{утил}} = 0,255$ г/л/день) на мини-ТЭЦ с мощностью 10 кВт и эмиссией углекислого газа $V = 73$ т/год (200 кг/день) при поглощении диоксида углерода 80 % потребуется объем суспензии микроводорослей ($V_{\text{мв}}$) (1):

$$V_{\text{мв}} = V \frac{0,8}{U_{\text{мв}}} = 200000 \frac{0,8}{0,255} = 627451 \text{ л} \quad (1)$$

Из данного объема за 1 цикл культивирования и очистки (27 суток) при центрифугировании можно получить сгущенную биомассу ($m_{\text{мв}}$), весом (при выходе биомассы = 3 г/л) (2):

$$m_{\text{мв}} = V_{\text{мв}} / 0,003 = 627451 / 0,003 = 1882,4 \text{ кг} \quad (2)$$

После обезвоживания масса сухой биомассы ($m_{\text{смв}}$) составит (3):

$$m_{\text{смв}} = m_{\text{мв}} \cdot 0,2 = 1882,4 \cdot 0,2 = 377 \text{ кг} \quad (3)$$

Сухая биомасса микроводорослей может быть использована для продажи или получения биодизеля. В среднем цена 100 гр сухой биомассы микроводорослей составляет около 400 руб. Тогда доход (Y) от продажи сухой биомассы микроводорослей составит (4):

$$Y = 377 \cdot 4000 = 1,51 \text{ млн руб} \quad (4)$$

Оценка величины предотвращенного экологического ущерба от загрязнения атмосферного воздуха стационарными источниками выбросов проводится на основе показателей удельного ущерба для экономического района, представляющих собой удельные стоимостные оценки ущерба от выброса единицы (1 условной тонны) приведенной массы загрязняющих веществ, выбрасываемых в атмосферный воздух (5):

$$Y_{\text{пр}}^a = Y_{\text{уд}}^a \cdot \sum_{K=1}^K M_{\text{нк}}^a \cdot K_{\text{э}}^a \quad (5)$$

где: $Y_{\text{пр}}^a$ – предотвращенный экологический ущерб от загрязнения атмосферного воздуха выбросами от стационарных источников в г-м регионе в течение отчетного периода времени в результате осуществления n-го направления природоохранной деятельности, руб.; $Y_{\text{уд}}^a$ – показатель удельного ущерба атмосферному воздуху, наносимого выбросом единицы приведенной массы загрязняющих веществ на конец отчетного периода времени для г-го экономического района РФ, руб./усл. т (для Северо-Западного региона = 667,5 руб./усл. т); $M_{\text{нк}}^a$ – приведенная масса выбросов загрязняющих веществ от стационарных источников выбросов, не поступивших в атмосферный воздух с k-го объекта (в т. ч. уловленных на ПГОУ) в результате осуществления г-го направления природоохранной деятельности в-том регионе в течение отчетного периода времени, усл. тонн; K – количество объектов (предприятий, производств, имеющих ГОУ) либо количество установок для улавливания и обезвреживания вредных веществ из отходящих газов, а также других природоохранных мероприятий, приведших к недопущению (ликвидации, снижению) попадания загрязняющих веществ в атмосферный воздух; $K_{\text{э}}^a$ – коэффициент экологической ситуации и экологической значимости состояния атмосферного воздуха территорий в составе экономических районов России (для Северо-Западного региона = 1,5).

Приведенная масса загрязняющих веществ рассчитывается (6):

$$M_{\text{нк}}^a = \sum_{i=1}^N m_i^a \cdot K_{\text{э}i}^a \quad (6)$$

где m_i^a – фактическая масса – го загрязняющего вещества или группы веществ с одинаковым коэффициентом относительной эколого-экономической опасности, не поступивших в атмосферный воздух от стационарных источников выбросов в результате осуществления n-го направления природоохранной деятельности (в т. ч. уловленных на ПГУ) в течение отчетного периода, тонн; $K_{\text{э}i}^a$ – коэффициент относительной эколого-экономической опасности i-го загрязняющего вещества или группы веществ (0,4); i – индекс загрязняющего вещества или группы загрязняющих веществ; N – количество учитываемых групп загрязняющих веществ.

Приведенная масса диоксида углерода по формуле (6):

$$M_{\text{нк}}^a = (73 \cdot 0,8) \cdot 0,4 = 23,36 \text{ усл. тонн}$$

Величина предотвращенного экологического ущерба по формуле (5):

$$Y_{np}^a = 667,5 \cdot 23,36 \cdot 1,5 = 23389 \text{ руб.}$$

На основании результатов исследования был разработан способ утилизации углекислого газа с использованием микроводорослей рода *Chlorella*. Этот метод позволит компаниям топливно-энергетического комплекса не только сократить выбросы углекислого газа в атмосферу, но и получать ценные компоненты из остаточной биомассы микроводорослей, например, для производства биотоплива. Разработанный метод соответствует принципам экономики замкнутого цикла и позволяет использовать отходы – углекислый газ – в качестве сырья для производства коммерчески выгодных продуктов с добавленной стоимостью. С биомассой микроводорослей в производстве биотоплива связаны большие коммерческие ожидания из-за ее значительного экономического эффекта. Биотопливо третьего поколения (биодизель и биоэтанол) производится из микроводорослей. Экономически и экологически наиболее эффективно выращивать микроводоросли в фотобиореакторах и открытых прудах, если они расположены вблизи тепловых электростанций – бесплатного источника углекислого газа и низкопотенциального отходящего тепла, необходимого для выращивания. Кроме того, для снижения стоимости питательной среды для микроводорослей можно добавлять сточные воды пищевой промышленности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24–17–20004).

Литература

- [1] Iea (2019) co2 emissions from fuel combustion 2019. Oecd, paris
- [2] Dlugokencky e, tans p (2022) recent global co2–noaa/esrl. www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/.
- [3] IPCC (2022) Mitigation of climate change 2022 – summary for policymakers (SPM).
- [4] Chia SR, Chew KW, Leong HY, Ho SH, Munawaroh HSH, Show PL (2021) CO2 mitigation and phycoremediation of industrial flue gas and wastewater via microalgae-bacteria consortium: possibilities and challenges. *Chem Eng J* 425:131436. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131436>
- [5] Salih H.A., Pokhrel J., Reinalda D., AlNashf I., Khaleel M., Vega L.F., Karanikolos G.N., Zahra M.A. Hybrid–Slurry/Nanofluid systems as alternative to conventional chemical absorption for carbon dioxide capture: A review. *Int. J. Greenhouse Gas Control*, 2021, vol. 110, art. 103415. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2021.103415>.
- [6] Mukherjee A., Okolie J.A., Abdelrasoul A., Niu C., Dalai A.K. Review of post-combustion carbon dioxide capture technologies using activated carbon. *J. Environ. Sci.*, 2019, vol. 83. pp. 46–63. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.03.014>.
- [7] Gür T.M. Carbon dioxide emissions, capture, storage and utilization: Review of materials, processes and technologies. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 2022, vol. 89, art. 100965. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2021.100965>
- [8] Bhatia S.K., et al. Carbon dioxide capture and bioenergy production using biological system – a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2019, vol. 110. pp. 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.070>.
- [9] Markewitz P, et al. (2012) Worldwide innovations in the development of carbon capture technologies and the utilization of CO2. *Energy Environ Sci* 5:7281–7305. <https://doi.org/10.1039/c2ee03403d>.
- [10] Li L, Zhao N, Wei W, Sun Y (2013) A review of research progress on CO2 capture, storage, and utilization in Chinese academy of sciences. *Fuel* 108:112–130. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.08.022>.
- [11] Daneshvar E, et al. (2022) Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO2 biofixation and biomass valorization – a review. *Chem Eng J* 427:130884. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884>.
- [12] Глазунова Д.М., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Секвестрация углерода атмосферы с использованием микроводорослей // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 1. С. 82–125. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.1.82-125>
- [13] Kumar M., et al. Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresour. Technol.*, 2018, vol. 247, pp. 1059–1068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.050>.
- [14] Rosa GM, Moraes L, Cardias BB, Souza MRAZ, Costa JAV (2015) Chemical absorption and CO2 biofixation via the cultivation of Spirulina in semicontinuous mode with nutrient recycle. *Bioresour Technol* 192:321–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.020>
- [15] Bhatt N.C., Panwar A., Bisht T.S., Tamta S. Coupling of algal biofuel production with wastewater // *Sci. World J.* 2014. V. 2014. Art. 210504. <https://doi.org/10.1155/2014/210504>.
- [16] Jiang L., Luo S., Fan X., Yang Z., Guo R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO2 // *Appl. Energy*. 2011. V. 88, No 10. P. 3336–3341. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.043>.
- [17] Saini R., Kapoor R., Kumar R., Siddiqi T.O., Kumar A. CO2 utilizing microbes a comprehensive review // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29, No 6. P. 949–960. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.009>
- [18] Morais, Michele et al. (2023). Microalgae Biotechnology and Chemical Absorption as Merged Techniques to Decrease Carbon Dioxide in the Atmosphere. 10.1007/978-981-99-2890-3_4.
- [19] Politaeva, N.; Ilin, I.; Velmochina, K.; Shinkevich, P. Carbon Dioxide Utilization Using *Chlorella* Microalgae. *Environments* 2023, 10, 109. <https://doi.org/10.3390/environments10070109>.

**ПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ КАРБОНИЗАЦИИ
ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ: СИНТЕЗ,
ПРИМЕНЕНИЕ И МЕХАНИЗМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ**

Т.В. Бауэр, Т.М., В.А. Поляков, Т.М. Минкина, О.Е. Хронюк, Ю.В. Бауэр, А.В. Барахов

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Загрязнение почв тяжелыми металлами (ТМ) является одной из самых серьезных экологических проблем в мире (Anaе et al., 2021; Xu et al., 2019). Посредством различных механизмов ТМ могут оказывать серьезное влияние на поверхностные и грунтовые воды, качество почвы, микробное разнообразие и эффективность сельскохозяйственного производства (He et al., 2019). Кроме того, ТМ не поддаются химическому и микробному разложению в почвах и могут накапливаться в сельскохозяйственных продуктах, что представляет большие риски для здоровья человека и окружающей среды при длительном воздействии (Wang et al., 2020). Поэтому ремедиация загрязненных почв с использованием высокоэффективных и экологически чистых методов является важной глобальной задачей современности (Wang et al., 2023). За последние годы были разработаны различные in-situ и ex-situ технологии восстановления почв: выемка и отсыпка, электрокинетическая экстракция, промывка, фито- или микробная ремедиация и стабилизация. Среди данных технологий стабилизация является наиболее эффективным методом иммобилизации ТМ путем их перевода из биодоступных форм в стабильные (Khalid et al., 2017). Для стабилизации ТМ в почвах используются различные материалы, такие как известь, красный шлам, бентонит, цеолит, композитные материалы на основе апатита и др. Однако в большинстве из них сложно совместить эффективность, отсутствие риска потенциального вторичного загрязнения и экономичность. Биочар, как продукт карбонизации органической биомассы в бескислородной среде, имеет широкий потенциал применения в качестве стабилизирующего материала, благодаря обилию кислородсодержащих функциональных групп, высокому значению pH и хорошо развитой пористой структуре (Li et al., 2023). Отличительной особенностью биочара является его высокая устойчивость к окислению, благодаря чему он может удерживать ТМ в почве в течение более длительного времени и высвобождать их гораздо медленнее, чем другие органические материалы (Elkhilfi et al., 2023). Однако, несмотря на имеющийся потенциал, адсорбционная способность биочара из-за относительно низких значений удельных площадей поверхности ограничена, что может приводить к сложностям его применения в почвах с высоким уровнем загрязнения ТМ, либо к большому расходу продукта. Одним из способов увеличения площади поверхности является создание композитов с более пористыми материалами, например, металл-органическими каркасами (МОК). Это относительно новый класс соединений, имеющих модульную структуру, состоящую из ионов металлов / металлических кластеров и мостиковой органической молекулы – линкера, связывающей ионы металлов в трехмерный каркас, пронизанный полостями и каналами (Yoon et al., 2011). Тип неорганического кластера и линкера сильно влияет на топологию каркаса, физико-химические свойства МОК и, следовательно, на его эффективность применения в качестве сорбента (Chaemchuen et al., 2015). Материалы этого класса характеризуются высокой термостабильностью, рекордными значениями удельной площади поверхности и повышенными сорбционными свойствами. Однако их использование в чистом виде ограничено из-за высокой стоимости и добавление к ним в процессе синтеза более дешевых углеродистых материалов, полученных из различных органических отходов, позволяет создавать композиты с высокими сорбционными характеристиками (Rojas et al., 2022).

Цель работы – синтез биочара из соломы пшеницы и нанокомпозита на его основе с МОК MIL-100(Fe); оценка эффективности использования полученных материалов в качестве сорбента для стабилизации ТМ (на примере Zn) в почве.

В качестве исходного сырья для получения биочара использовали солому пшеницы (*Triticum aestivum* L.), отобранную на сельскохозяйственных полях в и Кагальницком районе Ростовской области. Перед началом эксперимента солому пшеницы измельчили до размера 5–10 мм, затем несколько раз промывали дистиллированной водой с целью удаления примесей. После этого солому сушили при температуре 80 °С в сушильном шкафу до полного высыхания. Высушенное сырье массой 120г загружали в специально изготовленную лабораторную пиролизную установку (объем 2,2 л) из нержавеющей жаропрочной стали и помещали в муфельную печь. Для создания инертной атмосферы

в ретортур подавали азот (чистота > 99,99 %) со скоростью потока 50 мл/мин. Пиролиз проводился при 700 °С и скорости нагрева 10 °С/мин в течение 45 мин. После завершения процесса пиролиза реторту охлаждали до комнатной температуры, полученные образцы биочара извлекали и до мелкой фракции размером частиц менее 0,25 мм. Полученные образцы хранились в герметичных пластиковых контейнерах для последующих анализов и проведения модельного опыта.

Одним из главных критериев выбора МОК для получения композита было высокое значение площади удельной поверхности. В связи с этим был выбран MIL-100(Fe) на основе ионов железа и тримезиновой кислоты, обладающий крупными порами диаметром 25 и 29 Å (Hercájada et al., 2010). Нанокompозит получали методом in-situ формирования MIL-100(Fe) на углеродистой матрице биочара. Для этого трехкратное относительно выхода МОК количество биочара прибавлялось к суспензии порошка железа и тримезиновой кислоты, после чего проводили гидротермальный синтез при 120 °С в течение 20 часов в тefлоновом автоклаве Berghof BR-200. Успешность формирования композита и его чистота были подтверждены комплексом современных физико-химических методов анализа, включающих порошковую рентгеновскую дифракцию (XRD), ИК-спектроскопию, термогравиметрический анализ (ТГА), сканирующую электронную микроскопию с элементным картированием SEM-EDX (Helios Nanolab 660, Сколково). Удельные площади поверхности полученных образцов биочара и нанокompозита были измерены на анализаторе Top 200 (Altamira Instruments, China) при температуре 77 К. Удельная площадь поверхности и общий объем пор у биочара составили 37 м²/г и 0,046 см³/г, у нанокompозита – 387 м²/г и 0,194 см³/г, соответственно. Таким образом, покрытие биочара наночастицами MIL-100(Fe) позволило увеличить площадь поверхности материала в 10 раз.

Для изучения влияния сорбентов на стабилизацию Zn в техногенно загрязненных почвах был заложен модельный вегетационный опыт. Для этих целей использован чернозем обыкновенный карбонатный (0–20 см), отобранный на залежных участках ООПТ «Персиановская заповедная степь» (Фон 1) и на территории зоны влияния угольной промышленности (Фон 3) – в 200 м от насыпной толщи углеотвала шахты Аютинская (Ростовская область), прекратившей свою деятельность в 2006 г. В вегетационные сосуды с закрытой дренажной системой было помещено по 2 кг почвы, очищенной от растительных остатков и просеянной через сито с диаметром отверстий 3 мм. Затем были внесены сорбенты в дозах 1 % и 2 % от общего объема почвы. Инкубационный период почв с сорбентами длился 6 месяцев при поддержании влажности в образцах на уровне 60 ± 2 % от полной влагоемкости. Затем проводили посев тест-культуры ярового ячменя двурядного (*Hordeum sativum*) сорта «Ратник» семейства Мятликовые (Poaceae) в количестве 15 шт. на вегетационный сосуд и выращивали в лабораторных условиях при комнатной температуре (25 ± 2 °С) и освещении фотолампой (цикл свет-темнота 16/8 ч). Выращивание ярового ячменя проводили до окончания фазы кущения, после чего проводился отбор почвенных образцов для дальнейших анализов.

Общее содержание Zn в исследуемых образцах определено методом рентгенофлуоресцентного анализа (XRF). Фракционный состав соединений Zn проанализирован методом BCR (Ure et al., 1993) в модификации (Pueyo et al., 2008), который предусматривает выделение кислоторастворимой / обменной и связанной с карбонатами (F1), восстанавливаемой (F2), окисляемой (F3) и остаточной (F4) фракций. Концентрации металла во фракциях получены методом ICP-MS на приборе SUPEC 7000 (FPI, Китай). Выделяемые фракции по биодоступности разделены на три категории: биодоступные, потенциально биодоступные и небiodоступные (Devi and Saroha, 2014). Фракции F1 и F2 включены в категорию биодоступных, которые легко поглощаются растениями или выщелачиваются, представляя высокий экологический риск. Фракция F3 отнесена к потенциально биодоступной категории, которая подвергается разложению и выщелачиванию в очень жестких окислительных условиях. Фракция F4 относится к небiodоступной категории и признана нетоксичной.

Для выявления механизмов стабилизации Zn в исследуемых почвах модельного опыта выполнен их фазовый анализ методом XRD, идентифицированы входящие в их состав доминирующие кристаллические компоненты. Измерение дифракции почвенных образцов выполнено на дифрактометре Bruker D2 Phaser в диапазоне от 5 до 90° на медном аноде Cu-Kα (λ = 1,54056 Å) при ускоряющем напряжении 10 кВ. Расшифровка результатов осуществлялась с использованием ресурсов базы данных COD2016 версии COD-inorg 2022.06.29 и базы ICSD (Inorganic Crystal Structure Database). Для фазового анализа использовался программный пакет Match! версии 3.15 (Crystal Impact GbR, Германия).

В почве Фон 1, используемой в качестве контрольного варианта, выявлено низкое содержание Zn (67,0 мг/кг), не превышающее ПДК и ОДК (СанПиН 1.2.3685–21). В почве варианта Фон 3 диагностировано превышение ПДК и ОДК Zn (560,3 мг/кг) в 6 и 2,5 раза, соответственно. Основной особенностью формирования состава соединений Zn в почве Фон 1 является высокое содержание металла в остаточной фракции F4 (75 %) и низкое (4 %) в кислоторастворимой фракции F1 (табл. 1). Для загрязненной почвы Фон 3 доля стабильной фракции F4 снижается до 38 %. Доля нестабильных фракций (F1 + F2) увеличивается до 49 %. Отмечается накопление металла до 29 % в восстанавливаемой фракции F2 (табл. 1).

Таблица 1. Фракционный состав соединений Zn в исследуемых почвах (0–20 см)

Почва	Фракции			
	F1	F2	F3	F4
Фон 1	2,5 (4)*	7,1 (11)	5,7 (9)	46,6 (75)
Фон 3	108,5 (20)	158,1 (29)	75,4 (14)	201,2 (37)

* указаны абсолютные, мг/кг и (относительные, %) концентрации металла

За полгода проведения модельного опыта существенных изменений в содержании и составе соединений Zn в исследуемых почвах не выявлено (табл. 2). Внесение сорбентов в почвы способствовало более быстрой трансформации металла за счет перехода части нестабильных фракций (F1 и F2) в относительно стабильную (F3) и стабильную (F4). Более выраженное влияние сорбентов на данные изменения отмечалось в загрязненной почве Фон 3. Доля первых двух фракций (F1 + F2) Zn снизилась до 25–42 % в зависимости от дозы и вида сорбента. Внесение нанокompозита показало большую эффективность в стабилизации Zn по сравнению с биочаром. На всех вариантах наилучший результат установлен для дозы 2 % нанокompозита.

Таблица 2. Фракционный состав соединений Zn в исследуемых почвах модельного вегетационного опыта до и после внесения различных доз биочара (БЧ) и нанокompозита (НК)

Вариант опыта	Фракции			
	F1	F2	F3	F4
Фон 1	2,5 (4)*	6,2 (10)	6,1 (10)	46,9 (76)
Фон 1 + 1 % БЧ	0,8 (1)	3,7 (6)	5,7 (10)	47,2 (82)
Фон 1 + 1 % НК	0,4 (1)	4,0 (7)	5,9 (10)	50,1 (83)
Фон 1 + 2 % БЧ	0,3 (1)	2,1 (4)	5,6 (10)	49,6 (86)
Фон 1 + 2 % НК	0,1 (0)	1,5 (3)	5,7 (12)	40,9 (85)
Фон 3	100,1 (19)	149,0 (28)	86,3 (16)	204,2 (38)
Фон 3 + 1 % БЧ	81,9 (15)	142,3 (27)	62,6 (12)	242,9 (46)
Фон 3 + 1 % НК	58,3 (11)	129,1 (24)	79,1 (15)	276,4 (51)
Фон 3 + 2 % БЧ	57,9 (11)	114,7 (21)	71,8 (13)	301,4 (55)
Фон 3 + 2 % НК	31,4 (6)	98,8 (19)	71,5 (13)	329,7 (62)

* указаны абсолютные, мг/кг и (относительные, %) концентрации металла

С использованием метода XRD установлен фазовый состав исследуемых образцов почв. Показано, что все образцы характеризуются наличием терригенных минеральных фаз кварца (SiO_2), иллита ($\text{Al}_2\text{H}_2\text{KSi}_4\text{O}_{12}$), кальцита (CaCO_3) и пироксена (MgSiO_3) (рис. 1, 2). Минералогический состав образцов почвы варианта Фон 1 (рис. 1), помимо вышеперечисленных фаз, представлен также монтмориллонитом ($\text{Al}_{0,86}\text{Fe}_{0,1}\text{Hli}_{0,08}\text{Mg}_{0,14}\text{Si}_{3,9}\text{O}_{10}$). Образцы почвы варианта Фон 3 (рис. 2) отличаются присутствием дополнительных цинкосодержащих фаз: вульфингит (ZnSO_4), цинкозит ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) и франклинит ($\text{Fe}_{2,023}\text{Zn}_{0,977}\text{O}_4$). Обнаружение дифракционных пиков, характерных для вульфингита в рентгенограмме образца почвы может свидетельствовать о протекании механизма необратимой сорбции цинка, поскольку образование вульфингита является одним из возможных

результатов данного процесса (Alloway, 2008). Также, в условиях постоянной смены окислительно-восстановительного режима и высокого содержания сульфатов железа, характерных для данных почв, высока вероятность образования аутигенных металлосодержащих фаз, в частности, сульфата цинка (Minkina et al., 2024). Полученные данные XRD анализа свидетельствуют о том, что процессы осаждения сыграли значительную роль в стабилизации Zn в загрязненных почвах при внесении сорбентов.

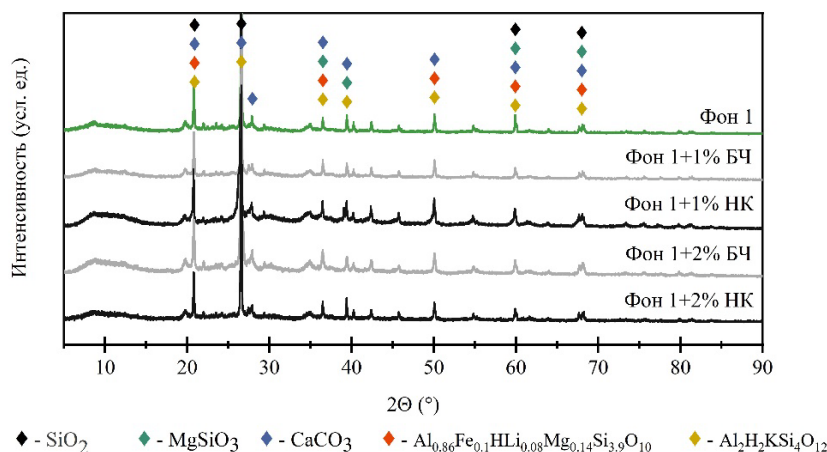


Рисунок 1. Дифрактограммы образцов почвы Фон 1 без и с внесением биочара (БЧ) и нанокompозита (НК) в дозах 1 и 2 %

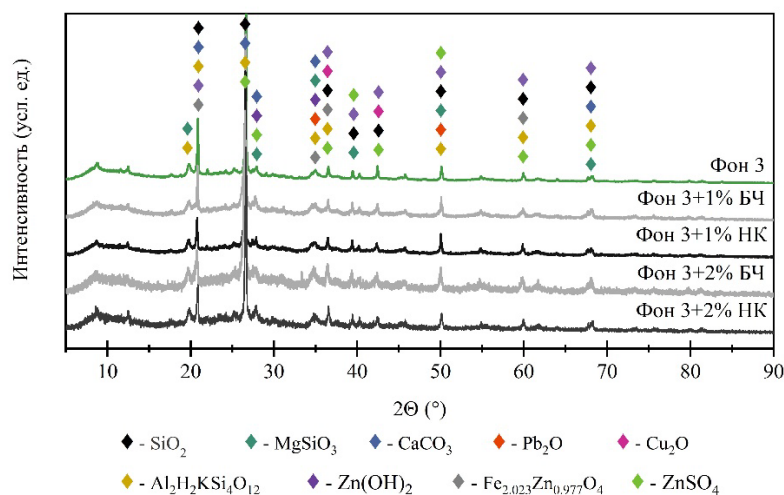


Рисунок 2. Дифрактограммы образцов почвы Фон 3 без и с внесением биочара (БЧ) и нанокompозита (НК) в дозах 1 и 2 %

Таким образом, проведенное исследование показало, что добавление синтезированных сорбентов в почвы способствовало более быстрой трансформации Zn за счет перехода части нестабильных фракций (F1 и F2) в относительно стабильную (F3) и стабильную (F4). Установлено, что процессы осаждения сыграли значительную роль в стабилизации Zn в загрязненной почве при внесении сорбентов. Выявлена большая эффективность нанокompозита, обладающего более высокими показателями пористости и удельной площади поверхности, в стабилизации металла по сравнению с биочаром.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-76-10054) в Южном федеральном университете.

Литература

- СанПиН 1.2.3685–21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. 2021. URL: www.pravo.gov.ru (Дата обращения 26.04.2022).
- Alloway B.J. Zinc in Soils and Crop Nutrition. Brussels, Belgium and Paris, France: IZA and IFA, 2008.
- Anae J., Ahmad N., Kumar V., Thakur V.K., Gutierrez T., Yang X.J., Cai C., Yang Z., Coulon F. Recent advances in biochar engineering for soil contaminated with complex chemical mixtures: remediation strategies and future perspectives // *Science of the total environment*. 2021. Vol. 767. P. 144351.
- Chaemchuen S., Zhou K., Kabir N.A., Chen Y., Ke X., Van Tendeloo G., Verpoort F. Tuning metal sites of DABCO MOF for gas purification at ambient conditions // *Microporous and Mesoporous Materials*. 2015. Vol. 201. P. 277–285.
- Devi P., Saroha A.K. Risk analysis of pyrolyzed biochar made from paper mill effluent treatment plant sludge for bioavailability and eco-toxicity of heavy metals // *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 162. P. 308–315.
- Elkhilfi Z., Iftikhar J., Sarraf M., Ali B., Saleem M.H., Ibranshabib I., Bispo M.D., Meili L., Ercisli S., Torun Kayabasi E. Potential role of biochar on capturing soil nutrients, carbon sequestration and managing environmental challenges: a review // *Sustainability*. 2023. Vol. 15. P. 2527.
- He L., Zhong H., Liu G., Dai Z., Brookes P.C., Xu J. Remediation of heavy metal contaminated soils by biochar: mechanisms, potential risks and applications in China. *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 252. P. 846–855.
- Horcajada P., Chalati T., Serre C., Gillet B., Sebrie C., Baati T., Eubank J.F., Heurtaux D., Clayette P., Kreuz C., Chang J.S., Hwang Y.K., Marsaud V., Bories P.N., Cynober L., Gil S., Férey G., Couvreur P., Gref R. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging // *Nature Materials*. 2010. Vol. 9, № 2. – P. 172–178.
- Khalid S., Shahid M., Niazi N.K., Murtaza B., Bibi I., Dumat C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils // *Journal of Geochemical Exploration*. 2017. Vol. 182. P. 247–268.
- Li Y., Yin H., Cai Y., Luo H., Yan C., Dang Z. Regulating the exposed crystal facets of α -Fe₂O₃ to promote Fe₂O₃-modified biochar performance in heavy metals adsorption // *Chemosphere*. 2023. Vol. 311. P. 136976.
- Minkina T., Fedorenko G., Nevidomskaya D., Fedorenko A., Sushkova S., Mandzhieva S., Chaplygin V., Litvinov Y., Ghazaryan K., Movsesyan H., Popov Y., Rensing C., Rajput V.D., Wong M.H. Biogeochemical and microscopic studies of soil and *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. plants affected by coal mine dumps // *Environmental Science and Pollution Research*. 2024. Vol. 31. № 1. P. 406–421.
- Pueyo M., Mateu J., Rigol A., Vidal M., Lopez-Sanchez, J.F., Rauret, G. Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils // *Environmental pollution*. 2008. Vol. 152. No. 2. P. 330–341.
- Rojas S., Rodríguez-Diéguez A., Horcajada P. Metal-Organic Frameworks in Agriculture // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2022. Vol. 14. P. 16983–17007.
- Ure A.M., Quevauviller P.H., Muntau H., Griepink B. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 1993. Vol. 51(1–4). P. 135–151.
- Wang Y., Liu Y., Zhan W., Zheng K., Wang J., Zhang C., Chen R. Stabilization of heavy metal-contaminated soils by biochar: Challenges and recommendations // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 729. P. 139060.
- Wang, Z., Zhang, Y., Sun, S., Hu, J., Zhang, W., Liu, H., He, H., Huang, J., Wu, F., Zhou, Y. Effects of four amendments on cadmium and arsenic immobilization and their exposure risks from pakchoi consumption // *Chemosphere*. 2023. Vol. 340. P. 139844.
- Xu J., Liu C., Hsu P.C., Zhao J., Cui Y. Remediation of heavy metal contaminated soil by asymmetrical alternating current electrochemistry // *Nature Communications*. 2019. Vol. 10. P. 137–139.
- Yoon M., Srirambalaji R., Kim K. Srirambalaji R., Kim K. Homochiral Metal–Organic Frameworks for Asymmetric Heterogeneous Catalysis // *Chemical Reviews*. 2011. Vol. 112. № 2. P. 1196–1231.

ГОРМОНАЛЬНЫЙ БАЛАНС СИСТЕМЫ ПЫЛЬЦА-ПЕСТИК ПЕТУНИИ ДВУХ КЛОНОВ ДО ОПЫЛЕНИЯ

Ю.В. Минкина

ИАТЭ НИЯУ МИФИ «Обнинский институт атомной энергетики, Обнинск, Россия

Развитие и дифференциация мужского и женского гаметофитов (пыльцевого зерна и зародышевого мешка) осуществляется под влиянием родительских тканей спорофита. В данной работе был изучен гормональный статус зрелой пыльцы и готового к опылению пестика у петунии двух клонов (самосовместимого и самонесовместимого). Сравнение проводили на уровне четырех гормонов: ИУК, АБК, цитокининов и гиббереллинов. При этом установлено, что гормональный статус каждого из компонентов системы, мужского гаметофита и спорофитных тканей пестика, имеет свою специфику. Для зрелого мужского гаметофита обоих клонов характерно высокое содержание ИУК и АБК ($0,083 \pm 0,012$ мкг/г сырого веса и $1,250 \pm 0,21$ мкг/г сырого веса), а для тканей пестика характерно более высокое содержание цитокининов ($0,680 \pm 0,08$ мкг/г сырого веса). Значимые различия между клонами на этом этапе исследований не выявлены.

В процессе развития мужского и женского гаметофитов петунии содержание фитогормонов в системе пыльца-пестик менялось, однако их динамика у двух клонов петунии была сходной. В процессе развития мужского гаметофита происходило повышение содержания ИУК и гиббереллинов к моменту раскрытия цветка. В пестиках обоих клонов происходило снижение содержания ИУК к моменту раскрытия цветка. Максимальный уровень АБК наблюдался в развивающихся пыльниках и пестиках за сутки до раскрытия цветка. Содержание цитокининов в пестиках возрастало к моменту раскрытия цветка.

Неопыленные пестики обоих клонов характеризовались повышенным (по сравнению с пыльцой) содержанием цитокининов (более высокий уровень у самонесовместимого клона). Следующий этап работы был посвящен определению гормонального статуса отдельных частей пестика – рыльца, столбика и завязи, поскольку каждая из них выполняет свою определенную функцию в межклеточных взаимодействиях мужского гаметофита с тканями пестика при опылении.

ИУК, в отличие от других гормонов, распределена более-менее равномерно по тканям неопыленного пестика петунии самосовместимого и самонесовместимого клонов – в рыльце, столбике и завязи. АБК в неопыленных пестиках обоих клонов преимущественно локализована в тканях рыльца, а максимальное содержание цитокининов (ЦК) – в тканях столбика (Табл.1.).

Таблица 1 Содержание фитогормонов в отдельных частях пестика у петунии, мкг/г сырого веса

Орган		ИУК	АБК	ЦК
Рыльце	Совместимое	$0,013 \pm 0,002$	$1,176 \pm 0,2$	$2,549 \pm 0,28$
	Несовместимое	$0,041 \pm 0,005$	$0,706 \pm 0,1$	$2,857 \pm 0,45$
Столбик	Совместимый	$0,036 \pm 0,006$	$0,420 \pm 0,06$	$14,794 \pm 2,22$
	Несовместимый	$0,014 \pm 0,002$	$0,060 \pm 0,009$	$19,307 \pm 2,89$
Завязь	Совместимая	$0,027 \pm 0,006$	0,000	$3,3 \pm 0,87$
	Несовместимая	$0,038 \pm 0,007$	0,000	$7,374 \pm 1,40$

Таким образом, в гормональном статусе двух составных частей системы пыльца-пестик перед опылением – зрелой пыльцы и неопыленного пестика, а также и отдельных частей пестика – рыльца, столбика, завязи, выявлены значимые различия, которые, очевидно, являются необходимой предпосылкой для успешного осуществления межклеточных взаимодействий между ними в процессе опыления и оплодотворения. Различия в гормональном статусе спорофитных тканей пестика у двух клонов петунии, возможно, связаны с экспрессией S-гена самонесовместимости, которая происходит в тканях столбика накануне раскрытия цветка и включает синтез S-РНКазы.

БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ТИПА «КЛЕТКИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫХ МАТРИЦАХ»: ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ**Д.Г. Лаврова¹, А.Н. Звонарев², Т.Г. Хонина³**¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия² Пуцинский научный центр биологических исследований РАН, Пуцино, Россия³ Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Инкапсулированные клетки в инертные биосовместимые матрицы предоставляет множество преимуществ для стабилизации микроорганизмов перед использованием свободных клеток или их адгезии на двумерных поверхностях в различных областях биотехнологии, медицины и экологии. Однако для комфортного окружения живых клеток микроорганизмов необходимо тщательно выбирать матрицу для последующего инкапсулирования. Поэтому разработка новых матриц, позволяющих интегрировать целые клетки в архитектуру материала без негативных изменений их биоактивности, является актуальной задачей. Обычно для иммобилизации используют органические природные и синтетические материалы на основе альгината кальция, каррагенана, хитозана, однако в природе микроорганизмы инкапсулированы в неорганические матрицы. Интеграция микроорганизмов в силикатную матрицу с применением методов золь-гель химии представляет собой простой путь для разработки сложных функциональных материалов с биокаталитической активностью – «живых» гибридных материалов. Однако традиционный золь-гель синтез из алкоксидов кремния, например, тетраэтоксисилана (ТЭОС), приводит к образованию плотных и жестких структур кремнезема на поверхности микроорганизмов, повреждению целых клеток под действием спиртовых растворителей и побочных продуктов синтеза, и, как следствие, к лизису клеточных мембран. Это послужило толчком для разработки стратегий, направленных на формирование неорганических частиц у поверхности клеток при участии органических структурообразующих компонентов. Ранее нашей научной группой были изучены аспекты инкапсулирования микроорганизмов в ОРМОСИЛ матрицы на основе ТЭОС и метилтриэтоксисилана (МТЭС) в присутствии органических полимеров полиэтиленгликоля (ПЭГ) или поливинилового спирта (ПВС) в качестве структуроуправляющих агентов методом одностадийного золь-гель синтеза. В качестве биологической части гибридного материала использовали метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, обладающие эффективной системой окисления короткоцепочечных спиртов. Показано, что при определенных условиях формируется целевая структура биогибридного материала «клетка в ОРМОСИЛ оболочке», обладающая защитными свойствами от воздействия стрессовых факторов окружающей среды [1]. Однако выделяющийся спирт в ходе золь-гель синтеза из ТЭОС и МТЭС ограничивает спектр потенциальных для использования микроорганизмов. Так, для снятия этих ограничений рассматривается возможность использования исходных соединений, не содержащих цитотоксичных побочных продуктов, например, применение органо-неорганических соединений кремния – полиолсилоксанов, которые получили широкое применение в медицине и биоминерализации [2], однако для инкапсулирования целых клеток не применялись.

В работе в качестве матрицы для инкапсулирования модельных дрожжевых клеток *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 в условиях основного (pH 7.6) золь-гель синтеза использовали полиглицеролаты кремния – глицеролат (ГК) и метилглицеролат кремния (МГК), синтезированные из ТЭОС и глицерина согласно методике [3] и любезно предоставлены Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН. Использование сложных эфиров кремния с глицерином вместо алкоксидов объясняется способностью глицерина, наряду с углеводами и аминокислотами, значительно повышать термостабильность и активность биомолекул [2].

Методами флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии впервые подтверждено образование оболочки на основе глицеролатов кремния вокруг живых клеток (рисунок 1).

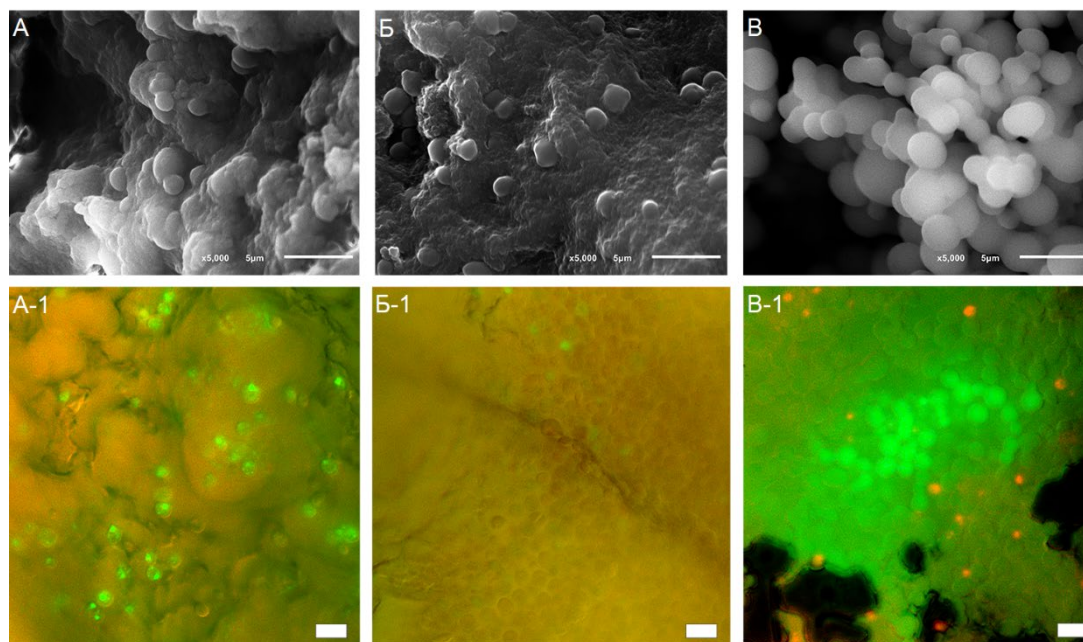


Рисунок 1. А-В – СЭМ-микрофотографии архитектуры биогибридных материалов на основе инкапсулированных клеток *Oogataea polymorpha* VKM Y-2559 в матрицы из полиолатных соединений кремния ГК: МГК в различных объемных соотношениях: А – ГК: МГК 100:0 об.%, Б – ГК: МГК 50:50 об.%, В – ГК: МГК 0:100 об.%; А-1 – С-1 – определение с помощью флуоресцентной микроскопии жизнеспособности инкапсулированных клеток *Oogataea polymorpha* VKM Y-2559 в матрицы из полиолатных соединений кремния ГК: МГК в различных объемных соотношениях: А-1 – ГК: МГК 100:0 об.%, Б-1 – ГК: МГК 50:50 об.%, В-1 – ГК: МГК 0:100 об.%

При увеличении гидрофобной добавки метилглицеролата кремния (МГК) наблюдался переход от оболочки пленочного типа к отдельным частицам золя на поверхности клеток. При этом увеличение МГК приводит к уменьшению степени инкапсулирования, так при использовании 100 об.% гидрофобной добавки при синтезе матрицы, наблюдали свободные как живые, так и мертвые (красное свечение флуоресцентных красителей) микроорганизмы. Определение дыхательной активности с применением биосенсорных технологий показано, что максимальными характеристиками чувствительности и стабильности обладает биокатализатор на основе инкапсулированных дрожжей в матрицы на основе ГК без добавления МГК. Увеличение в системе МГК до 50 об.% приводит к снижению характеристик чувствительности, что может быть связано с увеличением размера частиц золя на поверхности микроорганизмов, их неравномерному распределению и, как следствие, к увеличению диффузии субстратов. Дальнейшее увеличение гидрофобной добавки МГК приводит к увеличению дыхательной активности инкапсулированных клеток ввиду их состояния в свободной форме. Разработанные биогибридные материалы могут стать перспективными биокатализаторами при разработке биочувствительных платформ, биофильтров и биореакторов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20032, <https://rscf.ru/project/24-24-20032> / и правительства Тульской области

Литература

1. Lavrova D.G. et al. Impact of hydrophilic polymers in organosilica matrices on structure, stability, and biocatalytic activity of immobilized methylotrophic yeast used as biofilter bed // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. Vol. 150, P. 109879. DOI 10.1016/j.enzmictec.2021.109879
2. Shchipunov, Y. Biomimetic Sol-Gel Chemistry to Tailor Structure, Properties, and Functionality of Bionanocomposites by Biopolymers and Cells // *Materials*. 2024, Vol. 17, P. 224. DOI 10.3390/ma17010224
3. Khonina T.G., Safronov A.P., Shadrina E.V., Mechanism of structural networking in hydrogels based on silicon and titanium glycerolates // *J. Colloid Interface Sci.* 2012, Vol. 365, P. 81–89, DOI:10.1016/j.jcis.2011.09.018.

СОПИРОЛИЗ ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД И ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ КАК УСТОЙЧИВАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ

Т.М. Минкина, Т.В. Бауэр, А.Г. Тимофеева, С.С. Манджиева

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Осадок сточных вод является сложным побочным продуктом очистки стоков промышленных и бытовых вод, который помимо питательных и биологически активных веществ также содержит патогенные микроорганизмы, паразиты, тяжелые металлы (ТМ) и органические загрязнители, характеризуется высоким содержанием влаги и золы (Paz-Ferreiro et al., 2018). Ежегодно в мире на очистных сооружениях образуется около 200 млрд т осадков сточных вод при средней влажности 96 %, в т. ч. в России – свыше 100 млн м³ (Валиев и др. 2020), которые при ненадлежащем управлении становятся проблемой урбанизированных территорий, поскольку их утилизация зачастую приводит к вторичному загрязнению и может серьезно ухудшить здоровье человека (Gopinath et al., 2021). Поэтому безопасная утилизации осадков сточных вод вызывает растущую озабоченность во всем мире (Zhang et al., 2020).

Традиционные методы утилизации осадков сточных вод включают анаэробное сбраживание, захоронение и внесение в почву в качестве удобрений (Piao et al., 2016). При анаэробном сбраживании выделяется биогаз и разлагаются органические загрязнители в осадке (Amin et al., 2021), однако этот метод не обеспечивает достаточного уменьшения объема осадка. Внесение удобрений и захоронение требуют минимальных трудозатрат, но могут осуществляться только в регионах с обширными площадями и осадком с низким содержанием загрязняющих веществ (Teoh, Li., 2020).

Эффективным решением утилизации осадка сточных вод является его переработка в высокофункциональные углеродистые материалы путем его анаэробной карбонизации (Gopinath et al., 2021). Пиролиз способствует уменьшению объема осадка сточных вод, полному уничтожению патогенов и паразитов, а также разложению органических загрязнителей и фиксации тяжелых металлов в конечных продуктах процесса (Amin et al., 2021). Однако высокое содержание влаги и золы в осадках сточных вод делают процесс энергоемким и снижают качество биоугля, для которого характерно низкое содержание углерода и количество поверхностных функциональных групп, малая удельная поверхность и пористость, а также высокие концентрации ТМ (Ahmed et al., 2020). Дополнительно должен быть включен процесс сушки, поскольку уровень влажности в осадке должен быть менее 15 % перед пиролизом (Wu et al., 2021). Все это ограничивает функциональность и диапазон использования биоугля из осадка сточных вод.

Смешивание осадка сточных вод с различными видами лигнинсодержащей биомассы с более низкой загрязняющей нагрузкой в процессе пиролиза может считаться эффективным способом для снижения содержания поллютантов и обеспечивать получение экологически чистого углеродистого материала (Bolognesi et al., 2021). При этом совместный пиролиз осадков сточных вод и растительной биомассы может не только способствовать снижению концентрации металлов и усилению их иммобилизации за счет эффекта разбавления (Huang et al., 2017), но также и получению высокой удельной поверхности, увеличению содержания углерода, снижению зольности и созданию хорошо развитой пористой структуры продукта. При смешивании отходов понижается содержание влаги в сырье, что может улучшить экономическую составляющую, ввиду меньших энергозатрат на пиролиз (Dong et al., 2019).

Цель работы – выявление роли синергетического эффекта добавления лигнинсодержащей биомассы на свойства и экологическую безопасность биоугля из осадка сточных вод.

Для выявления роли синергетического эффекта сопиролиза на качество и безопасность продукта в лабораторной пиролизной установке были получены опытные образцы биоуглей из осадков сточных вод и лигнинсодержащей биомассы. Иловые осадки сточных вод были отобраны с АО «РостовВодоканал» после частичного обезвоживания и уплотнения после обработки на центрифуге. В качестве лигнинсодержащей биомассы использованы 2 вида отходов растениеводства: солома ячменя ярового (*Hordeum vulgare* L.) и кукурузы обыкновенной (*Zea mays*), отобранные на сельскохозяйственных полях в Кагальницком районе Ростовской области.

Перед проведением сопролиза солому ячменя и кукурузы разрезали до размера 5–10 мм, затем сушили при температуре 80 °С в сушильном шкафу до полного высыхания. Предварительно подготовленные растительные остатки смешивали с осадками сточных вод в соотношении 1:1 по массе, после чего загружали в специально изготовленную лабораторную пиролизную установку из нержавеющей жаропрочной стали и помещали в муфельную печь. Для создания инертной атмосферы в реактор подавали азот со скоростью потока 50 мл/мин. Для сравнения дополнительно были получены образцы биоугля из осадка сточных вод в чистом виде без добавления растительного сырья. Во всех случаях условия пиролиза и сопролиза были одинаковыми: температура 700 °С, время выдержки 60 мин и скорость нагрева 10 °С/мин. После завершения процесса реторту охлаждали до комнатной температуры, извлекали и взвешивали полученные образцы биоугля. Полученные образцы биоугля были обозначены как BSS – биоуголь из осадка сточных вод (SS), BSS-CS – биоуголь из осадка сточных вод и соломы кукурузы и BSS-BS – биоуголь из осадка сточных вод и соломы ячменя.

Выход биоугля рассчитывался по массовому соотношению биоугля к сырью по следующей формуле (1):

$$\text{Выход (\%)} = (M_{\text{биоугля}} / M_{\text{сырья}}) \times 100 \% \quad (1)$$

где $M_{\text{биоугля}}$ и $M_{\text{сырья}}$ – масса биоугля и сырья (г).

Значения pH используемого для пиролиза сырья и полученных биоуглей были измерены потенциометрическим методом. Содержание общей золы (зольности) оценивалось по остаточной массе после сжигания образцов в муфельной печи при температуре 750 °С в течение 6 часов.

Определение площади удельной поверхности ($S_{\text{ВЕТ}}$) и пористости полученных образцов выполнено на волюметрическом анализаторе «ASAP 2020» (Micromeritics, США) по методу низкотемпературной адсорбции азота. Расчет удельной поверхности осуществлен с использованием метода Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) по изотермам адсорбции N_2 в диапазоне относительного давления $P / P_0 = 0,04–0,10$. Значения $V_{\text{общ}}$ рассчитывали на основе правила Гурвича, исходя из количества адсорбированного газа при относительном давлении, близком к единице ($P / P_0 \approx 0,99$), т. е. насыщении (ISO 9277, 2010). Величины средних диаметров пор ($D_{\text{пор}}$) были определены с использованием следующего уравнения (Ahmed et al., 2018):

$$D_{\text{пор}} \text{ (нм)} = 4000V_{\text{общ}}/S_{\text{ВЕТ}} \quad (2)$$

Общее содержание ТМ (Cu, Zn, Pb, Cr, Mn, Ni и Cd) в осадке сточных вод и биоуглях, полученных из него без и с добавлением растительного сырья, определено методом рентгенофлуоресцентного анализа (XRF) на спектрокане «МАКС GV». Фракционный состав соединений ТМ в исследуемых образцах проанализирован широко распространенным в мировой практике стандартизированным методом последовательных селективных экстракций, рекомендованным European Community Bureau of Reference (BCR) в модификации (Pueyo et al., 2008). В соответствии с данной схемой выделяются четыре фракции металлов: кислоторастворимая / обменная (F1), восстанавливаемая (F2), окисляемая (F3) и остаточная (F4). Концентрации металлов во фракциях получены методом ICP-MS на приборе SUPEC 7000 (FPI, Китай). Выделяемые фракции по биодоступности разделены на три категории: биодоступные (F1 и F2), потенциально биодоступные (F3) и небiodоступные (F4).

В результате проведенных исследований установлено, что выход биоугля, полученного из осадка сточных вод, составил $53,48 \pm 0,17 \%$. Добавление лигнинсодержащей биомассы к осадку сточных вод привело к снижению выхода биоугля на 12,23–18,29 % из-за более низкой зольности исходного растительного сырья (табл. 1). Наибольшее снижение выявлено для образца BSS-CS, наименьшее – для BSS-BS. Величина pH биоугля из осадка сточных вод ($11,33 \pm 0,10$) была выше, чем у исходного осадка ($7,28 \pm 0,06$), добавление к нему растительных отходов в процессе пиролиза привело к снижению значений pH (до $9,92 \pm 0,08$).

Процесс пиролиза способствовал значительному увеличению зольности биоугля из осадка сточных вод: с $42,18 \pm 0,32 \%$ до $73,07 \pm 0,43 \%$ (табл. 1). Увеличение зольности биоугля может быть связано с концентрацией минеральных элементов и потерей органического вещества в осадке при термической обработке (Fan et al., 2020). Добавление растительной биомассы к осадку при термической обработке

привело к снижению содержания золы в биоугле до 13,4 % по сравнению с пиролизом осадка в чистом виде (табл. 1).

Величина $S_{\text{ВЕТ}}$ образца BSS, полученного из осадка сточных вод без добавления растительной биомассы, была примерно в 18 раз выше, чем у самого осадка (SS) и составила $14,02 \pm 0,19 \text{ м}^2/\text{г}$ (табл. 1). По общему объему пор ($V_{\text{общ}}$) выявлена аналогичная тенденция – увеличение в 12,5 раз по сравнению с осадком, а по их среднему диаметру (нм) – обратная.

Добавление лигнинсодержащей биомассы к осадку сточных вод в процессе пиролиза оказало значительное влияние на увеличение пористости получаемых образцов. Данный факт можно объяснить большим содержанием органических веществ в растительной биомассе по сравнению с осадком сточных вод, которые в процессе сопиролиза в результате термического разложения образуют большее количество летучих веществ и способствуют формированию и развитию пор. Параметры $S_{\text{ВЕТ}}$ и $V_{\text{общ}}$ биоугля достигли максимума ($25,31 \pm 0,26 \text{ м}^2/\text{г}$ и $0,066 \pm 0,003 \text{ см}^3/\text{г}$) при добавлении к осадку соломы ячменя. Во всех случаях добавление растительных остатков привело к снижению среднего диаметра пор у полученных образцов на 1,68–2,55 нм по сравнению с образцом BSS (табл. 1).

Таблица 1. Структурные и физико-химические характеристики осадка сточных вод (SS), соломы кукурузы (CS) и ячменя (BS), а также биоуглей, полученных из осадка отдельно (BSS) и путем сопиролиза с лигнинсодержащей биомассой (BSS-CS и BSS-BS)

Образец	Выход продукта (%)	pH	Зола общая (%)	$S_{\text{ВЕТ}}$ ($\text{м}^2/\text{г}$)	$V_{\text{общ}}$ ($\text{см}^3/\text{г}$)	Средний диаметр пор (нм)
SS	–	$7,28 \pm 0,06$	$42,18 \pm 0,32$	$0,78 \pm 0,02$	$0,004 \pm 0,001$	20,51
CS	–	$5,32 \pm 0,07$	$5,82 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,03$	$0,0045 \pm 0,001$	18,56
BS	–	$5,67 \pm 0,07$	$7,46 \pm 0,12$	$1,26 \pm 0,03$	$0,0047 \pm 0,001$	14,92
BSS	$53,48 \pm 0,17$	$11,33 \pm 0,10$	$73,07 \pm 0,43$	$14,02 \pm 0,19$	$0,050 \pm 0,003$	14,27
BSS-CS	$35,89 \pm 0,09$	$10,17 \pm 0,05$	$59,69 \pm 0,47$	$21,47 \pm 0,32$	$0,059 \pm 0,001$	12,45
BSS-BS	$41,25 \pm 0,23$	$9,92 \pm 0,08$	$63,58 \pm 0,70$	$25,31 \pm 0,26$	$0,066 \pm 0,003$	11,72

В результате проведенных исследований (табл. 2) содержания ТМ в образцах биоуглей (BSSB, BSS-CS и BSS-BS), а также исходного сырья (SS, CS, BS), используемого при их получении, установлено, что для растительной биомассы концентрации металлов незначительны и убывают в ряду для соломы кукурузы (CS): Mn (40,70 мг/кг) > Zn (15,43 мг/кг) > Cu (4,17 мг/кг) > Cr (3,49 мг/кг) > Ni (0,92 мг/кг) > Pb (0,63 мг/кг) > Cd (0,17 мг/кг); для соломы ячменя (BS): Mn (46,20 мг/кг) >> Zn (9,76 мг/кг) > Cr (2,96 мг/кг) > Cu (2,89 мг/кг) $\approx$ Pb (0,87 мг/кг) > Ni (0,69 мг/кг) > Cd (0,13 мг/кг).

Таблица 2. Содержание ТМ в осадке сточных вод (SS), соломе кукурузы (CS), ячменя (BS) и биоуглях, полученных из осадка отдельно (BSS) и путем сопиролиза с лигнинсодержащей биомассой (BSS-CS и BSS-BS)

Металл	Образец					
	SS	CS	BS	BSS	BSS-CS	BSS-BS
Cu	$95,02 \pm 2,27$	$4,17 \pm 0,32$	$2,89 \pm 0,17$	$146,11 \pm 4,75$	$97,38 \pm 1,12$	$83,06 \pm 1,65$
Zn	$576,13 \pm 11,83$	$15,43 \pm 0,12$	$9,76 \pm 0,08$	$952,68 \pm 13,92$	$569,07 \pm 9,84$	$448,23 \pm 11,67$
Pb	$20,31 \pm 1,82$	$0,63 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,10$	$29,56 \pm 2,31$	$17,96 \pm 1,15$	$16,52 \pm 0,98$
Cr	$76,43 \pm 3,26$	$3,49 \pm 0,07$	$2,96 \pm 0,23$	$211,62 \pm 4,71$	$179,23 \pm 3,81$	$152,19 \pm 2,39$
Mn	$1099,55 \pm 20,49$	$40,70 \pm 2,36$	$56,20 \pm 2,69$	$1284,32 \pm 23,42$	$1169,33 \pm 15,41$	$1032,17 \pm 12,09$
Ni	$46,12 \pm 2,40$	$0,92 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,04$	$70,09 \pm 2,71$	$59,18 \pm 2,27$	$48,73 \pm 1,62$
Cd	$1,13 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,00$	$1,89 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,02$

Концентрации исследуемых металлов в осадке (SS) значительно выше и убывают в ряду: Mn (1099,55 мг/кг) > Zn (576,13 мг/кг) > Cu (95,02 мг/кг) > Cr (76,43 мг/кг) > Ni (46,12 мг/кг) > Pb (20,31 мг/кг) >> Cd (1,13 мг/кг). Вероятно, высокая концентрация металлов в образце SS может быть связана с промышленными сточными водами местных предприятий, смешанными с хозяйственно-бытовыми сточными водами. Другим источником высоких концентраций металлов в осадке может быть коррозия старых городских канализационных трубопроводов, которые в основном состоят из оцинкованных и хромированных металлических труб, а также с масштабным использованием оцинкованных труб в бытовых помещениях (Weng et al., 2010).

После пиролиза концентрация всех металлов в биоугле из осадка сточных вод (BSS) возрастает (табл. 2), что может быть вызвано большей потерей веса органических соединений, приводящий к обогащению матрицы биоугля ТМ. В условиях совместного пиролиза осадков и растительной биомассы концентрация металлов ниже, чем в образце BSS, а для Zn, Pb и Cd снижается до уровня в сыром осадке и ниже (табл. 2) в основном за счет «эффекта разбавления». В целом, добавление соломы ячменя привело к большему снижению концентрации металлов в полученных биоуглях, чем добавление соломы кукурузы. Основная причина данной закономерности может заключаться в том, что совместный пиролиз осадка с соломой ячменя приводит к более высокому выходу биоугля по сравнению с совместным пиролизом с соломой кукурузы (табл. 1).

Биодоступность и токсичность ТМ в осадке сточных вод и полученных на его основе биоуглях зависят не только от их общей концентрации, но и, главным образом, от их форм соединений. Анализ фракционного состава металлов в исследуемых образцах выполнен на примере Zn вследствие его наибольшей концентрации по сравнению с другими ТМ (табл. 2). Полученные на основе модифицированной схемы BCR результаты позволили выявить существенные различия в характере распределения металла по фракциям после процесса пиролиза (табл. 3). Основной особенностью формирования состава соединений Zn в осадке является высокое содержание металла в восстанавливаемой фракции F2. Более 84 % Zn в осадке находилось в первых двух фракциях (F1 + F2), что предполагает более высокий потенциальный экологический риск от данных элементов, если осадок вносится непосредственно в почву.

Таблица 3. Фракционный состав соединений Zn в осадке сточных вод (SS) и биоуглях, полученных из него отдельно (BSS) и путем сопиролиза с соломой кукурузы (BSS-CS) и ячменя (BSS-BS)

Фракция	Образец			
	SS	BSS	BSS-CS	BSS-BS
F1	169,81 (29)*	232,57 (25)	97,15 (17)	58,21 (13)
F2	329,58 (55)	378,39 (40)	149,56 (26)	86,32 (20)
F3	28,52 (5)	123,96 (13)	27,16 (5)	34,63 (8)
F4	64,90 (11)	201,66 (22)	293,44 (52)	260,95 (59)

* указаны абсолютные и (относительные) концентрации металла

При термическом преобразовании осадка в биоуголь (BSS) доля биодоступных фракций (F1 + F2) снижается до 65 %. Однако, на долю первых двух фракций приходится более 50 % металла, что указывает на то, что Zn по-прежнему представляют высокий потенциальный экологический риск в образце BSS.

Совместный пиролиз осадка сточных вод с отходами растениеводства способствовал гораздо большей стабилизации Zn в полученных биоуглях за счет повышения концентрации металла в остаточной фракции (F4) (табл. 3). Следует отметить, что фракция F4 достигла более высокого процентного содержания при совместном пиролизе осадка с соломой ячменя (59 %), чем при добавлении соломы кукурузы (52 %). Различия в стабилизации металлов при сопиролизе с соломой ячменя и кукурузой могут быть обусловлены различиями в неорганических и органических компонентах данных биомасс. В соломе кукурузы выше содержание лигноцеллюлозы (81,5–92,9 % против 77,3–78,0 % (Espinosa et al., 2017)), а в соломе ячменя выше зольность (7,56 % против 5,82 %). Это указывает на то, что совместный пиролиз с соломой ячменя имеет больший потенциал для стабилизации металла с самым высоким процентом низкодоступной фракции F4.

Таким образом, проведенное исследование показало, что пиролиз является многообещающим методом переработки осадков сточных вод. Добавление к осадку лигнинсодержащей биомассы оказало синергетический эффект на свойства и экологическую безопасность биоугля. Процесс сопиролиза способствовал развитию показателей пористости, а также увеличению иммобилизации ТМ (Cu, Zn, Pb, Cr, Mn, Ni и Cd) путем их перехода из нестабильных фракций (F1, F2 и F3) в стабильную (F4). Наибольший эффект был достигнут при добавлении к осадку соломы ячменя.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-1122.

Литература

- Валиев В.С., Иванов Д.В., Шагидуллин Р.Р. Способы утилизации осадков городских сточных вод (обзор) // Российский журнал прикладной экологии. 2020. № 4(24). С. 52–63.
- Ahmed M.J., Hameed B.H. Insight into the co-pyrolysis of different blended feedstocks to biochar for the adsorption of organic and inorganic pollutants: A review // Journal of Cleaner Production. 2020. Vol. 265. P. 121762.
- Ahmed M.J., Hameed B.H. Adsorption behavior of salicylic acid on biochar as derived from the thermal pyrolysis of barley straws // Journal of Cleaner Production. 2018. Vol. 195. P. 1162–1169.
- Amin M.M., Taheri E., Fatehizadeh A., Rezakazemi M., Aminabhavi T.M. Anaerobic membrane bioreactor for the production of bioH₂: Electron flow, fouling modeling and kinetic study // Chemical Engineering Journal. 2021. Vol. 426. P. 130716.
- Bolognesi S., Bernardi G., Callegari A., Dondi D., Capodaglio A.G. Biochar Production from Sewage Sludge and Microalgae Mixtures: Properties, Sustainability and Possible Role in Circular Economy // Biomass Conversion and Biorefinery. 2021. Vol. 11. P. 289–299.
- Dong, Q., Zhang S., Wu B., Pi M., Xiong Y., Zhang H. Co-pyrolysis of sewage sludge and rice straw: thermal behavior and char characteristics evaluations // Energy Fuels. 2019. Vol. 34. P. 607–615.
- Espinosa E., Sanchez R., Otero R., Dominguez-Robles J., Rodriguez A. A comparative study of the suitability of different cereal straws for lignocellulose nanofibers isolation // International Journal of Biological Macromolecules. 2017. Vol. 103. P. 990–999.
- Fan J., Li Y., Yu H., Li Y., Yuan Q., Xiao H., Li F., Pan B. Using sewage sludge with high ash content for biochar production and Cu(II) sorption. Science of the Total Environment. 2020. Vol. 713. P. 136663.
- Gopinath G., Divyapriya V., Srivastava A.R., Laiju P.V., Nidheesh M.S., Kumar Conversion of sewage sludge into biochar: a potential resource in water and wastewater treatment // Environmental Research. 2021. Vol. 194. P. 110656.
- Huang H., Yang T., Lai F., Wu G. Co-pyrolysis of sewage sludge and sawdust/rice straw for the production of biochar // Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 2017. Vol. 125. P. 61–68.
- ISO – ISO 9277. Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption – BET method 2010. 2010.
- Paz-Ferreiro J., Nieto A., Méndez A., Askeland M.P.J., Gasco G. Biochar from biosolids pyrolysis: a review // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2018. Vol. 15. P. 956.
- Piao W., Kim Y., Kim H., Kim M., Kim C. Life cycle assessment and economic efficiency analysis of integrated management of wastewater treatment plants // Journal of Cleaner Production. 2016. Vol. 113. P. 325–337.
- Pueyo M., Mateu J., Rigol A., Vidal M., Lopez-Sanchez, J.F., Rauret, G. Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils // Environmental pollution. 2008. Vol. 152. No. 2. P. 330–341.
- Teoh S.K., Li L.Y. Feasibility of alternative sewage sludge treatment methods from a lifecycle assessment (LCA) perspective // Journal of Cleaner Production. 2020. Vol. 247. P. 119495.
- Weng H., Fu F., Liu Z., Zhang J., Ji Z., Ma X. Mechanisms of heavy metal stabilization during sludge drying // Acta Scientiae Circumstantiae. 2010. Vol. 30. P. 1401–1409.
- Wu B., Wang H., Wang C., Dai X., Chai X. Environmentally-friendly dewatering of sewage sludge: a novel strategy based on amphiphilic phase-transfer induced by recoverable organic solvent // Chemical Engineering Journal. 2021. Vol. 409. P. 128212.
- Zhang J., Jin J., Wang M., Naidu R., Liu Y., Man Y., Liang X., Wong M., Christie P., Zhang Y., Song C., Shan S. Co-pyrolysis of sewage sludge and rice husk / bamboo sawdust for biochar with high aromaticity and low metal mobility // Environmental research. 2020. Vol. 191. P. 110034.

НОВЫЙ МЕТАНОТРОФ ИЗ ИЛА ПРЕСНОВОДНОГО ОЗЕРА

Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина

Пуцинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, Россия

Аэробные метанотрофы – уникальные микроорганизмы, структурно и функционально специализированные на использовании метана в качестве источника углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996; Троценко и др., 2010). Метанотрофы широко распространены в различных экосистемах, включая водные (реки, озера, болота), играют важную роль в глобальных циклах углерода и азота, снижении выбросов антропогенного и природного парникового газа метана и имеют большой биотехнологический потенциал. Метанотрофные бактерии относятся к филуму *Pseudomonadota* и двум классам *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, а также ацидофильному филуму *Verrucomicrobiota* (Op den Camp et al. 2009; Хмеленина и др., 2018).

Цель работы – выделение и характеристика нового метанотрофа из ила пресноводного озера.

Новый штамм ВКМ В-3616 выделен из образца ила пресноводного озера (Центральный парк, Ташкент, Узбекистан). Пробу ила (0.5 г.) отбирали на глубине 30 см и помещали в колбу Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл стерильной минеральной среды «NMS» и инкубировали в атмосфере метан:воздух (1:1) при 29 °С две недели. Чистую культуру выделяли из единичных колоний с агаризованной среды «NMS» при высеве жидкой культуры после ряда пересевов и пассажей в атмосфере метана. Филогенетическое положение штамма определяли известными методами (Kaparullina et al., 2018).

Новый изолят представлен грамотрицательными короткими плеоморфными неподвижными палочками со II типом ВЦМ, колонии на «NMS» среде, выращенные в атмосфере метана, круглые, молочно-белые, с ровным краем, с выпуклым профилем, гладкой поверхностью и однородной структурой. Аэроб, оксидазо- и каталазоположителен, восстанавливает нитраты. Растет при 10–37°C (оптимально 28–30°C) и pH 4.5–9.5 (7.0–7.5), в присутствии 0–1 % NaCl (0.5 % NaCl). Использует C₁-субстраты (метан и метанол) в качестве источников углерода и энергии. Обладает pMMO и ассимилирует C₁-соединения в сериновом цикле. Не способен расти на ацетате, этаноле и других полиуглеродных соединениях. В качестве источников азота использует соли аммония, нитраты, медленно мочевины и аминокислоты (L-глутамин, L-аргинин, L-аланин), а также дрожжевой экстракт. Основной хинон Q-8. Доминирующие жирные кислоты C_{18:1ω8c} и C_{18:1ω7c}. Синтезирует поли-3-гидроксипирват. На основании секвенирования гена 16S рPHK штамм ВКМ В-3616 имеет наибольшее сходство 96.5–98.3 % с представителями рода *Methylocystis*. Данный уровень сходства ниже порогового значения (98.65 %), рекомендованного для разделения видов (Chun et al., 2018). Кроме того, филогенетический анализ метанмонооксигеназы PmoA показал, что штамм ВКМ В-3616 тесно связан с представителями рода *Methylocystis* (*M. hirsuta* CSC1^T, *M. silviterrae* FS^T, *M. rosea* SV97^T и *M. suflitae* NLS-7^T). Геном имеет общую длину 3,34 Mbp, содержание G + C составляет 63.4 %. Последовательности гена 16S рPHK и генома доступны в базе данных NCBI GenBank под номерами PP341305 и JAZHYN000000000. Средние значения ANI и dDDH между штаммом ВКМ В-3616 и близкородственными типовыми штаммами рода *Methylocystis* составили 78,0–82,4 % и 20,9–24,3 % соответственно, что ниже предложенных пороговых значений для видов. Таким образом, штамм ВКМ В-3616 представляет новый вид рода *Methylocystis*, для которого предложено название *Methylocystis borbori* sp. nov. Геном штамма ВКМ В-3616 содержит гены, кодирующие арсенатредуктазу (*arsC*, V3H18_RS05735, V3H18_RS16165) и арсенит транспортер семейства ACR3 (V3H18_RS05730), участвующие в нейтрализации токсичного мышьяка, гены детоксикации цианидов, цианид-3-меркаптопируват серотрансферазы (*sseA*, V3H18_RS04225, V3H18_RS15065) и роданазы (V3H18_RS01555, V3H18_RS00165), которые катализируют превращение цианида в тиоцианат. Кроме того, в геноме присутствуют гены устойчивости к теллуриду (*terB*, V3H18_RS00065) и меди *copC*, V3H18_RS03640). Геномный анализ продемонстрировал способность штамма адаптироваться к различным условиям среды обитания и участвовать в биоремедиации некоторых токсичных соединений.

МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ: БИОИНЖЕНЕРИЯ И НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН

**О.Н. Понаморева¹, Л.И. Трубицина², А.А. Моисеева¹, А.В. Абдуллатыпов^{1,3}, И.В. Трубицин^{1,2},
К.А. Егоров¹, С.В. Алферов¹, А.А. Леонтьевский²**

¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное структурное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

³ Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное структурное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

Введение. Развитие методов молекулярной биотехнологии и биоинформационного анализа актуализировало многие поставленные ранее задачи, решать которые традиционными методами микробиологии и биохимии слишком сложно и трудоемко. В современной биотехнологии применение генно-инженерных ферментов жизненно необходимо для оптимизации существующих биопроцессов и поиска новых [1]. В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес к использованию медьсодержащих оксидаз (МСО), так называемых «голубых» оксидаз, в качестве биокатализаторов для замены традиционных химических процессов в текстильной, целлюлозно-бумажной, фармацевтической промышленности. Структурно медьсодержащие (мультимедные) оксидазы содержат четыре атома меди типа I, II и III, которые различаются по структурной геометрии медного центра, спектральным характеристикам и магнитным свойствам [2]. Три типа атомов меди располагаются в разных местах активного центра в двух формах: моноядерный медный центр (Т1-центр) и трехядерный медный кластер (Т2/Т3), расположенный на расстоянии 12 Å от Т1-сайта. Спектральные свойства Cu-Т1 определяют голубую окраску этих оксидаз. Медьсодержащие оксидазы – большое семейство ферментов, которые катализируют окисление широкого спектра органических и / или неорганических субстратов путем четырехэлектронного восстановления кислорода до воды. Основными представителями этого семейства, которые нашли широкое биотехнологическое применение и считаются «зелеными» катализаторами, являются лакказы (п-бензендиол: кислород оксидоредуктаза, п-дифенол оксидаза (ЕС 1.10.3.2)) [3], а в некоторых практических приложениях – билирубиноксидазы (БО) (ЕС 1.3.3.5) [4]. Применение МСО в промышленном катализе вызвало большой интерес к конструированию МСО с повышенной стабильностью, активностью или специфичностью, адаптированной к конкретным условиям, для различных областей применения. Особое внимание уделяется термостабильности белков, способности функционировать в нейтральной и щелочной средах и величине редокс-потенциала активного центра ферментов (Т1-центра). Следует отметить, что аннотация медьсодержащих оксидаз, как лакказ, билирубиноксидаз или малых CofA-белков, весьма условна, и зависит не только от степени идентичности аминокислотной последовательности, но и от биохимических свойств фермента. В недавнем исследовании [5] в геноме лакказ-продуцирующего штамма *Acinetobacter* выявлены гены трех лакказоподобных белков, один из которых отнесли к семейству билирубиноксидаз. Авторы исследования считают, что полученная информация о медьсодержащих оксидазах в геноме *Acinetobacter* внесет вклад в развитие синтетической биологии для производства ферментов. Таким образом, задачи по поиску новых МСО актуальны.

За 20 лет было предпринято множество усилий по конструированию медьсодержащих оксидаз и пониманию механизмов их реакции с помощью сайт-направленного мутагенеза, а в последнее время, с помощью вычислительных расчетов и инструментов направленной эволюции [6,7]. Некоторым исследователям удалось осуществить сверхэкспрессию МСО в различных экспрессионных системах. Следует отметить, что экспрессионные системы на основе дрожжей, грамположительных и грамотрицательных бактерий имеют свои достоинства и недостатки.

В последнее время внимание исследователей привлекают бактериальные лакказы рода *Streptomyces*, которые способны функционировать в широком диапазоне pH, обладают необычно высокой устойчивостью к ингибиторам и могут быть использованы для различных коммерческих применений [8]. Структурно малые лакказы актинобактерий имеют небольшой размер и состоят только из двух доменов с гомотримерной организацией. Для поисковых исследований по получению бактериальных ферментов с заданными свойствами используют стандартные экспрессионные системы

на основе *E. coli*. Однако проблема гетерологичной экспрессии МСО в этих бактериях затруднена из-за образования телец включения и из-за недостаточного содержимого ионов меди в клетках хозяина, что необходимо для правильного фолдинга продуцируемых белков. Следовательно, выделение каталитически активных рекомбинантных МСО является нетривиальной задачей. Еще одной проблемой на пути разработки эффективных биокатализаторов на основе МСО является то, что бактериальные лакказы имеют низкий редокс-потенциал и, как следствие, незначительный спектр окисляемых субстратов. Следует отметить, что, в отличие от многих других оксидоредуктаз, МСО способны участвовать в прямом переносе электронов в биоэлектрокаталитических системах, что активно используется при разработке биокатодов в биотопливных элементах [9]. БО устойчивы в физиологических условиях, но по сравнению с бактериальными лакказами имеют более высокий потенциал Т1-центра и способны эффективно окислять билирубин, что используют при разработке биосенсоров [10] и биотопливных элементов [11].

Недавно в нашем научном коллективе обнаружены и исследованы новые двухдоменные лакказы актинобактерий: ScaSL из *Streptomyces carpinensis* [12] и CjSL из *Catenuloplanes japonicus* [13]. В отличие от других двухдоменных лакказ, эти два фермента характеризуются средним редокс-потенциалом (в диапазоне 0,47–0,51 В), но при этом они содержат в Т1-центре метионин в качестве аксиального лиганда (как низкопотенциальные лакказы). Эти результаты стали отправной точкой для поиска новых МСО и направленного дизайна бактериальных лакказ с определенным спектром окисляемых субстратов.

Поиск новых медьсодержащих оксидаз в геномах галотолерантных архей. По результатам анализа геномов галотолерантных архей, геномы которых аннотированы в базе данных NCBI, и штаммы доступны для заказа во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), выбраны три штамма для поиска медьсодержащих оксидаз *Haloterrigena turkmenica* ВКМ В-1734, *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 и *Haloferax gibbonsii* ВКМ В-1756. В геномах этих штаммов идентифицировали двенадцать генов МСО.

Для идентифицированных генов МСО провели множественное выравнивание аминокислотных последовательностей с последовательностями охарактеризованных лакказ (CLA из *Coprinus cinereus* (IHFUA), TLA из *Trametes villosa* (AAB47735), MLA из *Melanocarpus albomyces* (CAE00180)) и билирубиноксидаз (БО) (CotA из *Bacillus subtilis* (NP_388511), BOD из *Myrothecium verrucaria* (Q12737)). На основе анализа белковых последовательностей на наличие консервативных медь-связывающих аминокислот установили, что аминокислотные последовательности только шести генов относятся к МСО (по три последовательности – БО и лакказы).

При анализе идентифицированных генов МСО с помощью онлайн-программ InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) определили количество доменов и наличие сигнальных пептидов для каждого белка, что важно для оптимизации клонируемого гена.

Гетерологичная экспрессия целевых генов лакказ и билирубиноксидаз. После разработки праймеров, амплификации генов и секвенирования ампликонов удалось получить все шесть целевых генов. Для клонирования генов МСО использовали экспрессионный вектор pET-28a (+) и рестриктазно-лигазный метод [14]. Нарботку рекомбинантных плазмид проводили в компетентных клетках *Escherichia coli* DH5 α . Выделенными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3), способные продуцировать целевые белки. Схема индукции экспрессии генов МСО и очистка рекомбинантных белков представлена на рисунке 1.

Наличие шести остатков гистидина на С-конце рекомбинантных белков генов МСО, способных специфически связываться с Ni-NTA-сефарозой, позволило проводить очистку в одну стадию. Анализ результатов индукции и очистки проводили с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза. Большая часть белков генов МСО оказалась в осадке, однако для одной генетической конструкции с геном МСО с обрезанной последовательностью сигнального пептида из штамма *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 получили активную фракцию растворимого белка (рисунок 2). Темно-зеленая окраска раствора обусловлена реакцией окисления субстрата 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) аммониевая соль (АБТС) лакказой.

Выделенный рекомбинантный белок МСО окислял АБТС в диапазоне pH от 3,0 до 3,5 и 2,6–диметоксифенол (2,6–ДМФ) в щелочной области pH (от 8,0 до 8,5), что соответствует ожидаемой

физиологической способности белка окислять фенольные субстраты, что важно, так как это преимущество бактериальных лакказ по сравнению с грибными лакказами, pH-оптимум которых для фенолов находится при кислых-нейтральных значениях pH (от 3 до 7). Таким образом, полученный белок (предположительно лакказы) из штамма *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 обладает свойством, востребованным для его последующего технологического применения. Свойства белка, такие как температурный оптимум, термостабильность, спектральные и каталитические свойства будут изучены в дальнейшем.

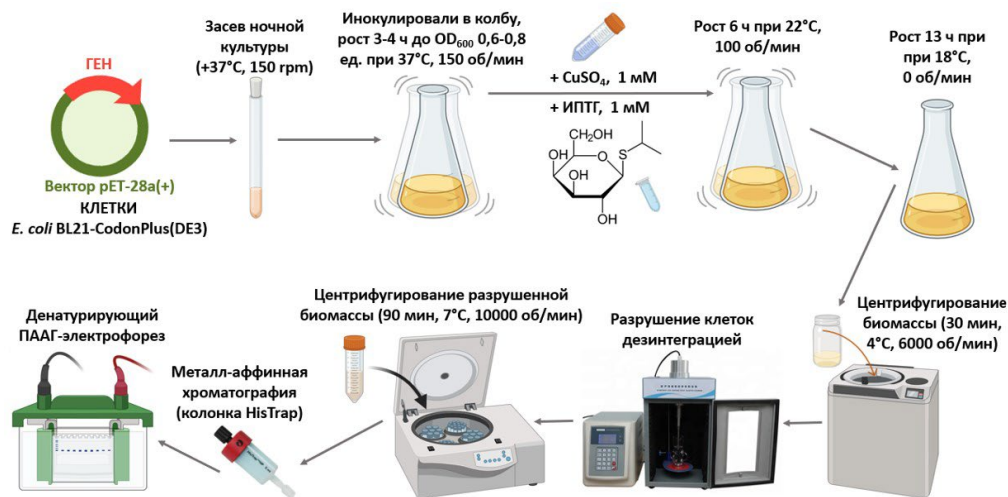


Рисунок 1 – Схема эксперимента индукции экспрессии генов МСО и очистки рекомбинантных белков

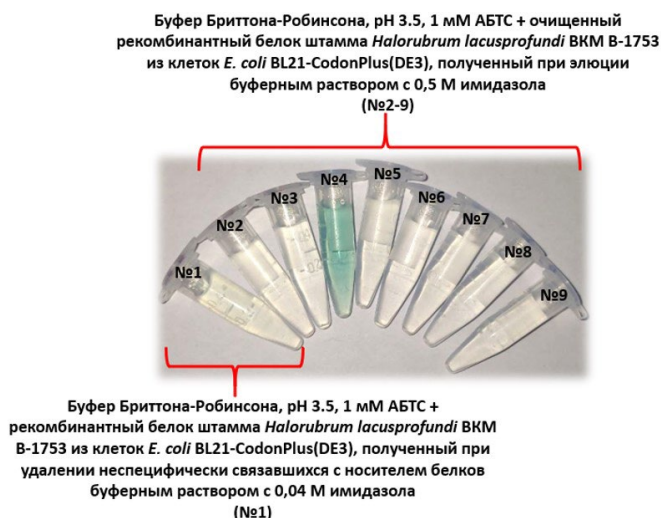


Рисунок 2 – Проверка очищенных фракций белка из штамма *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 на наличие активности из клеток *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) при внесении 30 мкл фермента к 500 мкл буферного раствора Бриттона-Робинсона (pH 3.5) с 1 мМ АБТС

Сайт-направленный мутагенез двухдоменной лакказы и характеристика мутантного фермента. Каталитическая активность МСО связана с восстановительным потенциалом атома меди Т1-центра. Считается, что этот центр отвечает за межэлектронный перенос от субстрата к ферменту с последующим внутриэлектронным переносом от Т1-центра к трехядерному кластеру. Аминокислотные остатки, координированные с медным сайтом, являются наиболее значимыми и определяющими восстановительный потенциал. Поскольку цистеин и два гистидиновых остатка в основном консервативны в Т1-центре МСО, только аксиальный остаток метионина влияет на внутримолекулярный перенос электронов и снижает эффективность поступления электрона от субстрата к ферменту. Присутствие аксиального метионина в бактериальных лакказах, к сожалению,

приводит к пониженному редокс-потенциалу T1-центра у этих ферментов (низкопотенциальные лакказы). Как уже отмечали выше, нам удалось охарактеризовать две новые двухдоменные лакказы как среднепотенциальные [12, 15]. Таким образом, существуют определенные аминокислоты не в ближайшем окружении медного центра, которые могут способствовать повышению редокс-потенциала этих ферментов и увеличению их способности окислять широкий спектр субстратов.

Для направленного дизайна двухдоменной лакказы использовали методологию сайт-направленного мутагенеза. Для выбора позиций для мутаций провели множественное выравнивание двухдоменных лакказ со средним и низким потенциалом, а также анализ трехмерной структуры этих ферментов. В качестве потенциальных позиций для мутаций выбрали два аминокислотных остатка фенилаланина (Phe232 и Phe233), которые присутствуют в ScaSL, но отсутствуют в двухдоменных лакказах с низким редокс-потенциалом. Эти остатки расположены в кармане связывания субстрата лакказы и относятся ко второй координационной сфере T1-центра. Наличие двух остатков фенилаланина в кармане связывания субстрата делает его гидрофобным в лакказах со средним потенциалом. Напротив, два аминокислотных остатка тирозина (Tyr), присутствующие в низкопотенциальных лакказах снижают гидрофобность кармана.

К сожалению, сайт-направленный мутагенез лакказы ScaSL по замене остатков Phe232 и Phe233 на Tyr привел к сдвигу активности фермента в кислую область pH без изменения окислительно-восстановительного потенциала, снижению термостабильности и pH-стабильности фермента. Однако мутант F232Y/F233Y более эффективно окислял типичный фенольный субстрат лакказ 2,6-диметоксифенол. Мутантный фермент не разлагал трифенилметановые красители без медиатора, но показал большую степень обесцвечивания азокрасителей в присутствии медиатора (АБТС) и был способен участвовать в прямом переносе электронов (ППЭ) в биоэлектрокаталитической системе с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) (рисунок 3).

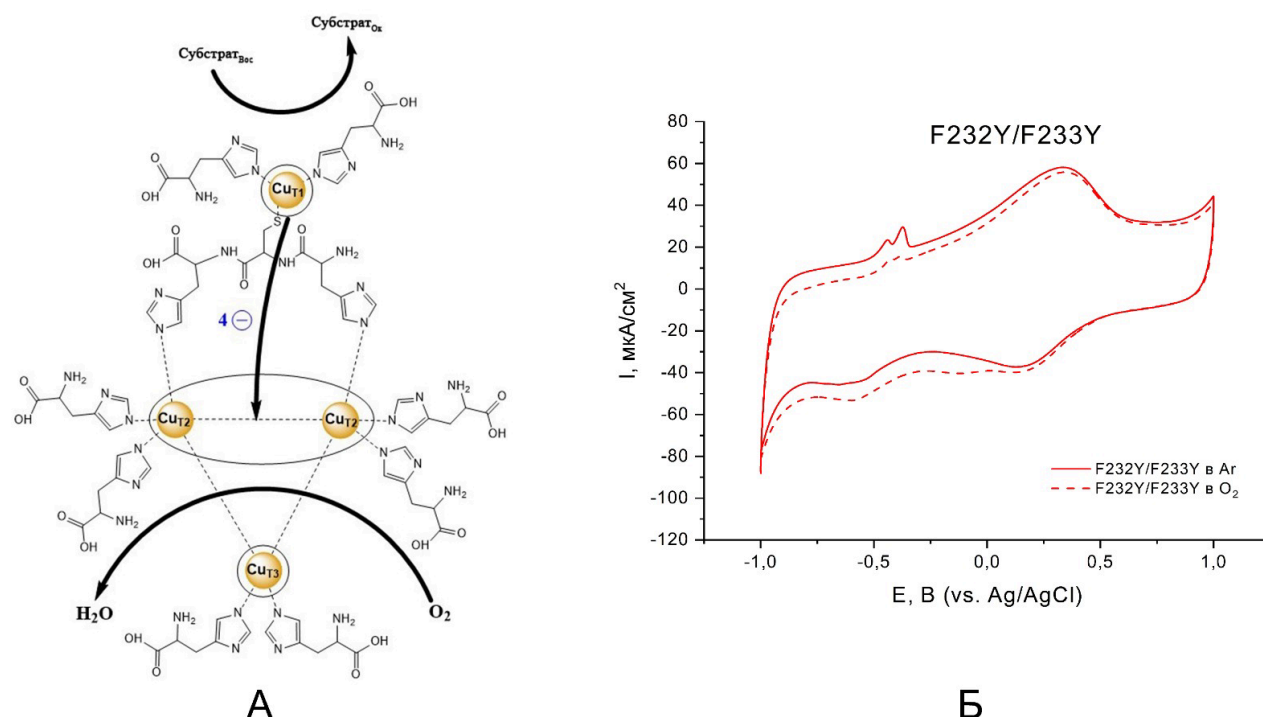


Рисунок 3 – Перенос электронов в системах с лакказами. А – Внутримолекулярный перенос электронов в активном центре лакказы. Б – Вольтамперограммы в среде аргона и в присутствии кислорода (рабочий электрод – стеклоуглеродный, модифицированных МУНТ и мутантной лакказой F232Y/F233Y; электрод сравнения – хлоридсеребряный; вспомогательный электрод – платиновый).

Увеличение тока восстановления в присутствии кислорода при потенциале +0,25 в (относительно хлорсеребряного электрода) свидетельствует о способности иммобилизованной лакказы участвовать в электрокаталитическом восстановлении молекулярного кислорода.

Заключение. Оксидоредуктазы, аннотированные в геноме архей как МСО, проявляют лакказную активность в слабощелочной среде, подобно лакказам актинобактерий, и способны участвовать в прямом переносе электронов в биоэлектрокаталитических системах с МУНТ. Полученные результаты подтверждают возможности получения новых биокатализаторов с заданными свойствами путем гетерологичной экспрессии отобранных архейных генов МСО в *E. coli*. Однако выбор эффективной экспрессионной системы необходимо продолжать. Полученные результаты по направленному мутагенезу двухдоменной лакказы ScaSL расширяют представления об аминокислотных детерминантах, способных изменять свойства бактериальных лакказ и подтверждают полученные ранее данные о комплексном влиянии различных факторов на окислительную активность лакказ. Полученные в работе результаты являются дополнением к набору известных аминокислотных детерминант, что вносит значительный вклад в разработку подходов для машинного обучения по направленному дизайну эффективных биокатализаторов на основе двухдоменных бактериальных лакказ.

Литература

1. Orsi, E., et al., Automated in vivo enzyme engineering accelerates biocatalyst optimization. *Nat Commun*, 2024. 15(1): p. 3447.
2. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, 1996. 96(7): p. 2563–2606.
3. Zerva, A., et al., Applications of Microbial Laccases: Patent Review of the Past Decade (2009–2019). *Catalysts*, 2019. 9(12): p. 26.
4. Mano, N. and L. Edembe, Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. 50: p. 478–485.
5. Pooalai, R., et al., Genomic analysis uncovers laccase-coding genes and biosynthetic gene clusters encoding antimicrobial compounds in laccase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 2022. 12(1).
6. Mate, D.M. and M. Alcalde, Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 2015. 33(1): p. 25–40.
7. Takamura, E., et al., Site-Directed Mutagenesis of Multicopper Oxidase from Hyperthermophilic Archaea for High-Voltage Biofuel Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021. 193(2): p. 492–501.
8. Kaur, R., R. Salwan, and V. Sharma, Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications. *Process Biochemistry*, 2022. 118: p. 133–144.
9. Dey, B. and T. Dutta, Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. *Bioelectrochemistry*, 2022. 146: p. 108144.
10. Hooda, V., et al., Bilirubin enzyme biosensor: potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis. *Biotechnology Letters*, 2017. 39(10): p. 1453–1462.
11. Torrinha, Á., et al., Microenergy generation and dioxygen sensing by bilirubin oxidase immobilized on a nanostructured carbon paper transducer. *Electrochimica Acta*, 2023. 445: p. 142061.
12. Trubitsina, L.I., et al., A Novel Two-Domain Laccase with Middle Redox Potential: Physicochemical and Structural Properties. *Biochemistry (Moscow)*, 2023. 88(10): p. 1658–1667.
13. Trubitsina, L.I., et al., Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. *PeerJ*, 2021. 9: p. e11646.
14. Tan, S. – I., I.S. Ng, and Y. – J. Yu, Heterologous expression of an acidophilic multicopper oxidase in *Escherichia coli* and its applications in biorecovery of gold. *Biorecovery and Bioprocessing*, 2017. 4(1): p. 20.
15. Abdullatypov, A., et al. Functionalization of MWCNTs for Bioelectrocatalysis by Bacterial Two-Domain Laccase from *Catenuloplanes japonicus*. *Nanomaterials*, 2023. 13, 1–24.

КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ КАК СПОСОБ КОММУНИКАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ В СИСТЕМЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА

Н.В. Будаговская

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Живые организмы характеризуются высокой функциональной динамичностью, что обеспечивает им хорошую адаптацию к меняющимся внешним условиям среды. В данной работе исследовалось влияние изменения водно-солевого баланса в прикорневой зоне растений на динамику быстрых ответных реакций листьев по разработанной ранее методике [1, 2]. В качестве тест-системы использовался интегральный показатель функциональной активности растений – рост, чувствительный к изменению водно-солевого баланса тканей. Применение метода лазерной интерференционной ауксанометрии позволило регистрировать изменение скорости роста листьев в небольших временных интервалах (мин, ч). Измерения скорости роста листьев проводили с помощью ауксанометра ЛИНА-ЭМЗД (Россия) в непрерывном режиме в течение нескольких часов. Объектами исследования являлись растения ячменя сорта Ауксиняй. Растения выращивали в песке, поливали водопроводной водой. Изменение водно-солевого баланса в корневой зоне осуществляли внесением раствора хлористого натрия (NaCl) до концентрации 100 мМ и последующим отмыванием корней от NaCl. Эксперименты проводили при температуре 20–23° С и влажности воздуха 60 %.

На рис. 1 представлен график скорости роста 2-го листа растения ячменя. Можно видеть, что процесс имеет колебательный характер. Это затухающие колебания с околочасовым периодом, вызванные изменением водно-солевого баланса в корневой зоне. Предварительно в зону корней был добавлен раствор NaCl, после чего последовало отмывание корневой системы от соли. Колебания продлились 2 ч. Ранее в наших экспериментах были получены также затухающие колебания с околочасовым периодом длительностью 2 ч при измерении скорости роста листьев риса, но они были вызваны последовательным добавлением воды и NaCl в корневую зону растения [3]. Это привело к функциональному разбалансу в растении и индуцировало колебания. Продемонстрированные в данной работе низкочастотные затухающие колебания скорости роста листьев, вызванные изменением водно-солевого баланса в корневой зоне, могут быть связаны с дальним транспортом воды на уровне целого растения (корни – стебель – листья). Помимо отмеченных затухающих колебаний с околочасовым периодом при измерении скорости роста листьев растений постоянно регистрируются колебания с периодом менее минуты. Примером таких колебаний могут быть колебания, представленные на Рис. 2 (фрагмент Рис. 1) и в наших предыдущих публикациях [3–5]. Это тургорные автоколебания. Они могут быть связаны с транспортом воды на клеточном уровне (ближний транспорт) и включать участие сократительных белков клеток и трансмембранную гидравлическую проводимость через водные каналы.

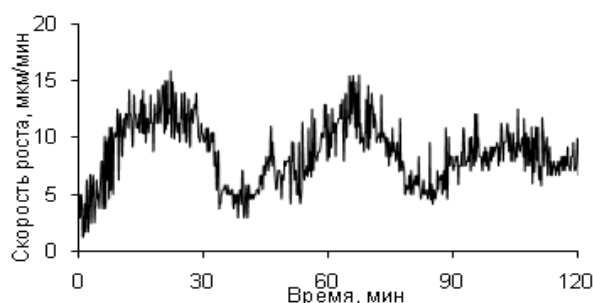


Рис. 1. Колебания скорости роста 2-го листа 15-дневного растения ячменя. Измерению скорости роста листа предшествовало добавление NaCl в корневую зону с последующим отмыванием корней от NaCl.

Интересно отметить, что увеличение амплитуды таких колебаний предшествует увеличению скорости роста листьев. Рост растяжением связан с транспортом воды в растении и увеличение амплитуды колебаний транспорта воды свидетельствует об усилении водного потока в тканях растений, что будет способствовать увеличению скорости роста листьев. Рис. 3 демонстрирует такую

ситуацию. Увеличение амплитуды тургорных колебаний тканей листа было связано с последующим увеличением скорости роста этого листа с 20 мкм/мин до 25 мкм/мин. После повышения скорости роста листа до нового стационарного уровня амплитуды колебаний снизились, что указывает на регуляторный характер таких изменений. Усиление амплитуды тургорных колебаний было отмечено нами также при восстановлении роста листьев овса, подавленного засолением в зоне корней [5]. При адаптации растений к засолению транспорт воды в растении восстанавливается также как и процесс роста.

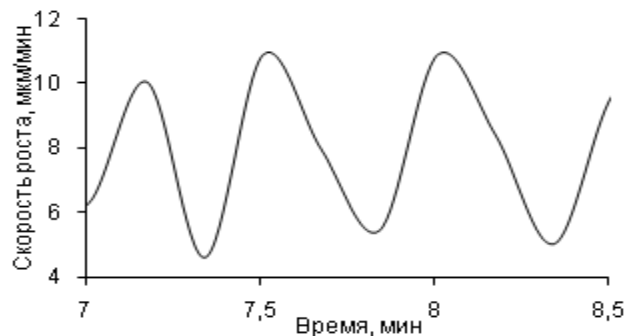


Рис. 2. Фрагмент Рис. 1.

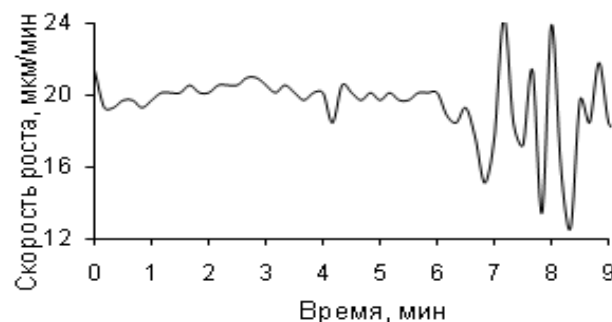


Рис. 3. Колебания скорости роста 2-го листа 12-дневного растения ячменя.

Автоколебательный режим функциональной активности растений характеризует временную упорядоченность процессов. Согласованность ритмов процессов на клеточном, органном, организменном уровне создает основу для динамической регуляции функциональной активности посредством изменения амплитуд и частот колебаний.

Литература

1. Budagovskaya N.V. Interaction of plant shoots and roots: dynamics and stability // *Biophotonics and Coherent Systems*, Belousov L.V., Voeikov V.L., Martinuik V., (Eds.), Springer. – New-York, – 2007. – P. 213–223.
2. Budagovskaya N.V. Rapid response reactions of buckwheat plant shoots on changes in sodium chloride concentration at the root zone and blockage of calcium channels // *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. – 2010. – 4, – P. 128–130.
3. Будаговская Н.В. Низкочастотные и высокочастотные колебания скорости роста растений при изменении водно-солевого баланса // *Актуальная биотехнология* – 2022. – № 1, – С. 322.
4. Будаговская Н.В. Изменение колебательного режима скорости роста и тургора растений гречихи после внесения хлористого натрия в корневую зону // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: сб. науч. тр.* – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во. – 2022. – С. 4–9.
5. Будаговская Н.В. Скорость растяжения и сжатия тканей листьев растений при изменении водно-солевого баланса // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: сб. науч. тр.* – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во. – 2021. – С. 4–9.

ИЗУЧЕНИЕ БУФЕРНОЙ СПОСОБНОСТИ ПОЧВЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К КАДМИЮ

М.В. Бурачевская, Т.М. Минкина, И.В. Замулина, А.В. Щербаков, Е.В. Лацынник

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Из всех загрязнителей Cd все больше привлекает внимание исследователей в связи с недостаточностью данных о необходимости его для жизни растений и серьезных нарушениях процессов обмена у человека и животных при поступлении в организм этого элемента [1]. Канцерогенные и мутагенные свойства Cd позволили считать его одним из самых опасных тяжелых металлов (ТМ), относящимся к 1 классу опасности [2]. Кадмий обладает высокой токсичностью и вместе с тем высокой миграционной способностью. Основным источником поступления Cd в растения является почва, содержание в которой этого ТМ колеблется от 0.01 до 1.1 мг/кг (незагрязненная) и до десятков и сотен мг/кг (загрязненная), создавая в последнем случае условия серьезной опасности для человека [3].

Исследования показали, что биодоступность ТМ и, следовательно, их опасность для окружающей среды зависят от таких показателей почвы, как pH, катионообменная способность, содержание органического вещества, тонкодисперсных частиц, R_2O_3 и карбонатов [4, 5, 6, 7]. Исходя из данных показателей, была разработана шкала и на ее основе градация буферности почв по отношению к ТМ [8, 9]. Анализ природы буферной способности почв по отношению к загрязняющим веществам сводится в целом к анализу закономерностей поглощения их почвами. Чем больше и прочнее может удерживать почва ТМ, тем активнее они удаляются из почвенного раствора в состав твердых фаз почв и тем лучше почва сопротивляется повышению их концентрации в растворе [10]. Буферную способность почвы по отношению к ТМ следует понимать, как способность почвы противостоять резкому изменению её свойств и состава при внешних воздействиях, нарушающих природный режим почвообразования (в данном случае – загрязнение ТМ) [8]. При рассмотрении механизмов проявления буферной способности почв можно исходить из анализа физико-химических свойств и уровня загрязнения. Это позволяет глубже понять механизмы буферной способности почв по отношению к поллютантам при техногенной нагрузке.

Цель работы – влияние свойств почв на буферную способность по отношению к Cd при модельном загрязнении.

Объекты и методы. Для эксперимента использован верхний слой (0–20 см) чернозема южного среднемощного тяжелосуглинистого, отобранном в Миллеровском районе Ростовской области целинного участка, вдали от возможных источников загрязнения.

Для изучения влияния свойств почвы на проявление ее буферной способности по отношению к Cd был заложен модельный опыт. Для закладки модельного опыта отбирался 0–20 см слой чернозема южного (Haplic Chernozem) [11] среднемощного тяжелосуглинистого целинного участка Миллеровского района Ростовской области, находящегося вдали от возможных источников загрязнения.

Нитраты Cd вносили в дозах 2, 5, 10 ориентировочно допустимых концентраций (ОДК) (ОДК Cd = 2 мг/кг) [12], что соответствовало встречающемуся уровню загрязнения почв исследуемым металлом [13]. Дозы загрязнения имитировали уровень содержания поллютанта в изучаемых техногенно загрязненных почвах и соответствовали невысокому (2 ОДК), среднему (5 ОДК) и высокому (10 ОДК) загрязнению. Варианты опыта отражали почвы с различным гранулометрическим составом и содержанием органического вещества, карбонатов и pH при помощи создания почвенных субстратов при помощи смешивания почвы и кварцевого песка в разных соотношениях (25, 50 и 75 % от массы почвы). Общее содержание металла в почве определяли рентген-флуоресцентным методом с использованием спектрокана Макс-GV.

В сосуды с дренажем помещали по 2 кг почвы, просеянной через сито диаметром ячеек 2 мм. Инкубацию проводили при температуре +20...+ 22 °C и естественном освещении. Почву инкубировали 6 мес. при влажности 60 % от полной влагоемкости.

Общие физические и химические характеристики отобранной почвы проанализированы стандартными методами: pH потенциометрическим методом при соотношении почва: вода 1 : 2.5 [14]; содержание органического вещества титриметрическим методом (бихроматное окисление по

Тюрину) [14]; емкость катионного обмена (ЕКО) – по методу Шаймухаметова [15]; содержание обменных катионов – по методу Пфедфера в модификации Молодцова и Игнатовой [16], содержание карбонатов комплексометрическим методом по Кудрину; гранулометрический состав почвы пипет-методом с пирофосфатной подготовкой пробы [14].

На основе исследуемого чернозема южного тяжелосуглинистого были смоделированы почвенно-песчаные субстраты с различным гранулометрическим составом: среднесуглинистым (25 % песка), легкосуглинистым (50 % песка) и супесчаным (75 % песка).

В исходной почве и приготовленных на ее основе почвенно-песчаных субстратах рассчитана буферность по отношению к ТМ по методике Ильина [8, 9]. Согласно методике буферность почвы рассчитывается как сумма показателей: $pH_{водн} + (\text{содержание гумуса, \%}) + (\text{содержание карбонатов, \%}) + (\text{содержание подвижных полуторных оксидов Fe + Al, \%}) + (\text{содержание частиц } <0.01 \text{ мм, \%})$. Каждому показателю, используемому в расчетах, соответствует определенное количество баллов в зависимости от его величины и вклада в буферные свойства почв. Цена балла для каждого показателя определена эмпирически [8, 9]. На основе методики [8] была рассчитана градация буферности почв по отношению к ТМ [9].

Результаты и дискуссия. Исходная незагрязненная почва – чернозем южный среднесуглинистый имеет высокую буферную способность по отношению к металлу. Исследуемая почва имеет следующие физико-химические свойства: pH 7.6, 49.3 % физической глины, 24.6 % ила, содержание гумуса 5.0 %; карбонатов – 0.3 %; ЕКО – 36.5 cM(+) / кг, содержание Cd – 0,29 мг/кг.

При постепенном разбавлении почвы песком в образующихся почвенно-песчаных субстратах также происходило изменение основных физико-химических свойств: закономерное уменьшение содержания гумуса (до 6 раз), физической глины (до 5 раз), Fe + Al (до 9 раз), карбонатов (до 4 раз). Отмечается уменьшение значений pH со слабощелочных значений до нейтральных (табл. 1).

Таблица 1 – Значения буферности по отношению к тяжелым металлам, физико-химические свойства почвы при модельном загрязнении и разной степени разбавления песком

Вариант	Гумус, %	Физическая глина, %	Fe + Al, %	CaCO ₃ , %	pH H ₂ O	Буферность*, баллы	Градация буферности*
Ч _ю (контроль)	4,95	49,30	6,16	0,33	7,56	47	Высокая
Песок	–	–	–	–	6,95	10	Очень низкая
Контроль +25 % песка	3,78	39,10	5,39	0,26	7,42	35	Повышенная
Контроль +50 % песка	2,10	21,91	2,57	0,14	7,27	30	Средняя
Контроль +75 % песка	0,77	12,56	0,69	0,09	7,00	19	Низкая
Cd 2 ОДК	4,90	49,41	6,12	0,30	7,48	41	Высокая
Cd 2 ОДК + 25 % песка	3,71	39,20	5,24	0,27	7,35	35	Повышенная
Cd 2 ОДК + 50 % песка	1,94	21,01	2,60	0,11	7,19	30	Средняя
Cd 2 ОДК + 75 % песка	0,64	11,96	0,78	0,10	7,00	19	Низкая
Cd 5 ОДК	4,60	49,10	6,10	0,30	7,30	41	Высокая
Cd 5 ОДК + 25 % песка	3,50	39,00	5,14	0,25	7,25	35	Повышенная
Cd 5 ОДК + 50 % песка	2,02	21,54	2,40	0,13	7,22	30	Средняя
Cd 5 ОДК + 75 % песка	0,60	11,30	0,60	0,10	7,04	19	Низкая
Cd 10 ОДК	4,50	48,00	6,00	0,30	7,10	40	Высокая
Cd 10 ОДК + 25 % песка	3,40	38,90	5,10	0,21	7,10	34	Повышенная
Cd 10 ОДК + 50 % песка	1,82	20,74	2,50	0,10	7,00	30	Средняя
Cd 10 ОДК + 75 % песка	0,55	11,00	0,60	0,10	6,80	18	Низкая

*Примечание. Баллы и градация буферной способности почв рассчитаны по методике Ильина [8, 9]

При загрязнении почвы наблюдаются небольшие изменения в сторону ухудшения показателей основных физико-химических показателей почвы (снижения содержания органического вещества, физической глины, полуторных оксидов, карбонатов), а также подкисление почвы. В случае

загрязненных почвенно-песчаных субстратов наблюдается такая же тенденция, что и для незагрязненных вариантов, наиболее заметная при самом высоком уровне загрязнения (10 ОДК). Градация буферности на загрязненных вариантах остается на высоком уровне, что говорит о большой устойчивости исследуемого чернозема к загрязнению.

Выявлено снижение буферной способности почвы при разбавлении ее песком. Чем больше степень разбавления, тем заметнее уменьшается буферная способность: с повышенной (25 % песка), через среднюю (50 % песка) до низкой (75 % песка). В вариантах с загрязнением данная закономерность была более выражена, что связано с уменьшением содержания высокодисперсных частиц и значений pH. Данная тенденция происходит за счет процессов гидролиза солей, вытеснения протона из ППК при адсорбции ТМ и ассоциации катионов ТМ с ионами OH⁻ [17, 18]. Внесение Cd в почву не оказывало столь сильного влияния на изменение буферной способности по сравнению с разбавлением песком. В случае загрязнения 10 ОДК Cd снижение баллов буферности (до 18 баллов), но не привело к изменению ее градации.

Таким образом, с облегчением гранулометрического состава чернозема южного отмечается уменьшение его буферной способности по отношению к Cd от высокой (исходная почва) до низкой (75 % песка). Внесение в почву металла в дозе 2, 5 и 10 ОДК не оказывало существенного влияния на градацию буферности почвы. Почва с супесчаным составом имела низкую буферность и была мало устойчива к загрязнению, эффект особенно выражен при высоком уровне загрязнения в дозе 10 ОДК металла.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ, проект № 23–24–00646.

Литература

1. Потатуева Ю.А., и др. Влияние карбоната кадмия на урожай сельскохозяйственных культур, подвижность кадмия в почве и накопление растениями // *Агрохимия*. – 2005. – № 8. – С. 50–57.
2. Методические указания по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве. М.: Минздрав СССР, 1982. Изд. 2. 57 с.
3. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях: Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
4. Amery F., et al. The copper-mobilizing-potential of dissolved organic matter in soils varies 10-fold depending on soil incubation and extraction procedures // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – V. 41. – P. 2277–2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
5. Serrano S., Garridoa F., Campbell C.G., Garcí'a-González M.T. Competitive sorption of cadmium and lead in acid soils of Central Spain // *Geoderma*. – 2004. – V. 125. – P. 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.04.002>
6. Sungur A., Soylak M., Ozcan H. Investigation of heavy metal mobility and availability by the BCR sequential extraction procedure: relationship between soil properties and heavy metals availability // *Chem. Speciat. Bioavailab.* – 2014. – V. 26. – P. 219–230. <https://doi.org/10.3184/095422914x14147781158674>
7. Zhang J., et al. Bioavailability and soil to crop transfer of heavy metals in farmland soils: a case study in the Pearl River Delta, South China // *Environ. Poll.* – 2018. – V. 235. – P. 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.106>
8. Ильин В.Б. Оценка буферности почв по отношению к тяжелым металлам // *Агрохимия*. – 1995. – № 10. – С. 109–113.
9. Ильин В.Б., Сысо А.И. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах и растениях Новосибирской области. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2001. – 229 с.
10. Мирошниченко Н.Н., Пашенко Я.В., Фатеев А.И. Показатели буферности и устойчивости в оценке барьерной функции почв // *Почвоведение*. – 2003. – № 7. – С. 808–817.
11. WRB. IUSS Working Group WRB. 2014. World reference base for soil resources 2014, International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome.
12. СанПиН 1.2.3685–21 Об утверждении санитарных правил и норм «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания» постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 2.
13. Minkina T.M., Nevidomskaya D.G., Pol'shina T.N., Fedorov Y.A., Mandzhieva S.S., Chaplygin V.A., Bauer T.V., Burachevskaya M.V. Heavy metals in the soil–plant system of the Don River estuarine region and the Taganrog Bay coast // *J. Soils Sediments*. – 2017. – V. 17(5). – P. 1474–1491. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1381-x>
14. Воробьева Л.А. Теория и практика химического анализа почв. М.: ГЕОС, 2006. 400 с.
15. Шаймухаметов М.Ш. К методике определения поглощенных Са и Mg в черноземных почвах // *Почвоведение*. – 1993. – № 12. – С. 105–112.
16. Мамонтов В.Г., Гладков А.А., Кузелев М.М. Практическое руководство по химии почв. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. – 225 с.
17. Минкина Т.М., и др. Влияние сопутствующего аниона на баланс катионов в системе почва раствор (на примере чернозема обыкновенного) // *Почвоведение*. – 2014. – № 8. – С. 932–932.
18. Пинский Д.Л., и др. Влияние состава и свойств почв и почвенно-песчаных субстратов, загрязненных медью, на морфометрические показатели растений ячменя // *Почвоведение*. – 2023. – № 3. – С. 393–404.

**АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ ПАУ ИЗ ПОЧВ УГЛЕОТВАЛОВ ВОДОЙ
В СУБКРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ****С.Н. Сушкова, Т.С. Дудникова, Е.Г. Шуваев, А.А. Немцева, Е.М. Антоненко***Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*

Как правило южные регионы России являются лидерами по производству сельскохозяйственной продукции. На ряду с этим добыча угля и его переработка является основной отраслью промышленности южных областей и республик. Почвы, формирующиеся вблизи таких объектов промышленности подвержены накоплению различных химических загрязнителей, в том числе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). В мировой практике при оценке и прогнозировании экологического состояния почв определяют содержание 16 ПАУ из списка приоритетных поллютантов агентства по охране окружающей среды США (US EPA, 2020). На сегодняшний день не существует единой концепции оценки экологического состояния почв, загрязненных ПАУ. При этом качество оценки и прогноза экологического состояния почв ограничено рядом факторов, среди которых релевантность общепринятых методик определения массовой доли поллютантов в почве. Принято считать, что наиболее полное извлечение ПАУ из почв проходит в аппарате Сокслета (до 99 %) (Castro-Guijarro et al., 2021). Существенным недостатком метода является время, затрачиваемое на экстракцию, соответствующее 24 ч, что существенно замедляет анализ и экспресс-оценку экологического состояния почв. Методы экстракции, основанные на использовании органических растворителей, широко используются при анализе содержания ПАУ из твердых матриц (Mukhopadhyay et al., 2020). Общим недостатком таких методов является большой расход токсичных летучих и полуметучих реагентов, таких как гексан, дихлорметан, метанол, ацетон, ацетонитрил и др. (Wu et al, 2019, Soursoy et al., 2023). Альтернативой данным методам экстракции выступает извлечение поллютантов из почв в среде субкритической воды. Субкритическая вода – это вода, которая находится в жидком состоянии при температуре выше 100 °С и давлении выше давления насыщенного пара. В таких условиях вода меняет свои физико-химические свойства, формируя среду для экстракции неполярных соединений, таких как ПАУ. Цель работы состояла в подборе условий температуры и времени экстракции ПАУ из почв подверженных влиянию угледобывающих предприятий.

В целях анализа содержания ПАУ в почвах углеотвалов впервые подобраны условия и апробирован метод экстракции приоритетных ПАУ с использованием воды в субкритическом состоянии. Проведен анализ образцов почв, отобранных на территории терриконов шахты Майская, Самбекская и Аютинская с близкими физическими и химическими свойствами, но разными по уровню техногенной нарушенности почвами, включая техногенно нарушенный чернозем (№ 30), артиндустрат (№ 13) и токсииндустрат (№ 53). Свойства почв приведены в таблице 1.

Таблица. 1 Свойства почв, выбранных для апробации метода субкритической водной экстракции

Шахта	Тип почв	pH	Сорг	CaCO ₃	Ил	Физ. глина	Ca ²⁺	Mg ²⁺
			%				ммоль(мг-экв)/100 г почвы	
Майская	Техногенно нарушенный чернозем	8,2	1,6	3,3	32,8	52,8	32,1	3,1
Самбековская № 27	Токсииндустрат	6,8	4,8	1,2	20,6	58,4	28,0	6,4
Аютинская	Артиндустрат	7,9	2,3	4,4	32,4	58,4	28,6	8,2

Эксперимент по извлечению ПАУ из почвы проводили в лабораторном экстракторе для проведения субкритической водной экстракции с использованием деионизированной воды в качестве растворителя. Для достижения оптимального выхода ПАУ в экстракт тестировались различные параметры температуры: 230 °С, 240 °С, 250 °С, 260 °С и 270 °С, а также давления: 60 атм, 65 атм, 70 атм, 75 атм, 80 атм. Время экстракции составляло 20 минут. Повторность опыта 9-кратная. Пробоподготовку образцов почв для анализа проводили общепринятым методом (ГОСТ 17.4.4.02–84).

Для экстракции ПАУ в среде субкритической воды 1 г воздушно сухой почвы помещали в экстракционный картридж, приливали 20 мл деионизированной воды и помещали в муфельную печь соблюдая параметры температуры, давления и времени. По прошествии 20 минут картридж развинчивали, двух- или трехкратно фильтровали содержимое до прозрачности раствора. Полученный водный экстракт смешивали с 5 мл н-гексана и помещали на механический встряхиватель на 15 минут. Разделение слоев проводили на делительной воронке объемом 50 мл последовательно в три этапа с очередной порцией гексана. Объединенный гексановый экстракт пропускали через воронку с безводным сульфатом натрия в чистую сухую круглодонную колбу, упаривали на ротационном испарителе при температуре водяной бани 48 °С до сухого остатка. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила при перемешивании в течение 30 минут, а затем собирался в виаллу. Качественное и количественное определение ПАУ в экстрактах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе AGILENT 1260.

Проведено сравнение результатов экстракции 16 приоритетных ПАУ из почв методом субкритической водной экстракции с методами извлечения, основанными на использовании органических растворителей: метод ультразвуковой экстракции (US EPA 3550C) 30 мл смесью гексан: дихлорметан 1:1 и метод омыления (РД 52.10.556–95, 1996).

Определены оптимальные условия извлечения ПАУ, отличающихся по физическим и химическим свойствам из почв углеотвалов с различной степенью техногенной нарушенности. Установлено, что наибольший выход нафталина в экстракт происходит при температуре 230 °С и давлении 60 атм. По мере увеличения количества бензольных колец в молекуле ПАУ их молекулярная масса, липофильность и сродство с почвой повышается, энергетические затраты на десорбцию поллютанта с поверхности почвенных частиц затрудняется (Морозов и др., 2012, Liang et al, 2016). Вследствие этого наибольший выход 3-х кольчатых полиаренов наблюдался при температуре 240 °С и давлении 65 атм, 4-х и 5-ти кольчатых при температуре 250 °С и давлении 70 атм, а 6-ти кольчатых при температуре 260 °С и давлении 75 атм. При этом в оптимальных условиях экстракции ПАУ доля извлеченных соединений составила 89,6 %, 90,6 %, 90,5 %, 90,9 % и 90,7 % для 2-х, 3-х, 4-х, 5-ти и 6-ти кольчатых ПАУ соответственно. Установлено, что степень техногенной нарушенности почв углеотвалов существенно не влияет на степень извлечения полиаренов. В большинстве случаев при идентичных параметрах давления и температуры доля извлеченных ПАУ из техногенно нарушенных черноземов не более чем на 1,5 % превышает значения, полученные для артииндустратов и токсиндустратов. Для целей унификации метода на основе графического моделирования степени извлечения ПАУ различной кольчатости выделены оптимальные параметры экстракции для всего пула исследуемых веществ: температура – 250 °С, давление – 70 атм. В этих условиях извлечение 2-х кольчатых полиаренов составляет 80,48 %, 3-х кольчатых 88,18 %, 4-х кольчатых – 90,54 %, 4-х кольчатых 90,90 % и 6-ти кольчатых – 81,75 % (табл. 2).

Таблица 2. Доля извлеченных ПАУ из почв углеотвалов при экстракции субкритической водой в оптимальных условиях температуры и давления (А), растворителем в среде ультразвука (Б) и методом омыления (В), %

Название ПАУ	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
	Майская (Чернозем техногенно преобразованный)			Самбековская № 27 (Токсиндустрат)			Аютинская (Артииндустрат)		
Нафталин	79,68	98,80	65,16	80,48	97,51	57,66	80,16	97,90	65,91
Антрацен	87,56	96,52	68,93	87,56	96,00	61,25	88,18	96,10	61,82
Хризен	90,54	95,29	64,54	90,09	93,81	67,78	89,64	93,53	67,39
Бенз(а)пирен	89,28	94,28	66,71	90,63	93,09	61,71	90,90	93,47	70,08
Бенз (g, h, i) перилен	81,00	91,72	67,62	80,76	90,91	66,87	80,92	91,73	69,95

Несмотря на то, что эффективность извлечения ПАУ из почв углеотвалов при ультразвуковой экстракции выше, чем в условиях субкритической воды, существенным недостатком метода является использование большого количества органических растворителей при затрачиваемом времени – 60 минут. Так, на извлечение поллютантов смесью растворителей в среде ультразвука расходуется порядка 40 мл дихлорметана, 50 мл гексана и 2 мл ацетонитрила. В то время, при субкритической водной экстракции расход органических растворителей сокращается до 15 мл гексана и 1 мл ацетонитрила при времени 20 минут.

Таким образом, апробирован метод экстракции ПАУ из почв углеотвалов различной техногенной нарушенности в среде субкритической воды. Подобранны оптимальные условия температуры и давления для экстракции ПАУ с различными физическими и химическими свойствами. Установлено, что по мере увеличения количества бензольных колец в молекуле, энергетические затраты на извлечение поллютантов повышаются и составляют 230 °С и 60 атм по 2-х кольчатым, 240 °С и 65 атм – по 3-х кольчатым, 250 °С и 70 атм – по 4-х и 5-ти кольчатым и 260 °С и 70 атм – по 6-ти кольчатым. Для целей унификации метода оптимальными параметрами экстракции ПАУ из почв углеотвалов являются температура 250 °С и давление 70 атм ввиду того, что извлечение большинства полиаренов в заданных условиях достигает порядка 90 %. Сравнение метода экстракции ПАУ субкритической водой с широко распространенными методами, основанными на использовании органических растворителей, показало, что субкритическая экстракция ПАУ позволяет в три раза снизить затраты на реагенты и сократить время экстракции при высокой степени извлечения наиболее опасных высокомолекулярных ПАУ.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075–15–2022–1122, а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства Южного федерального университета ("Приоритет 2030")".

Литература

- ГОСТ 17.4.4.02–84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа, Дата введения 1986–01–01
- Морозов Г.С., Савин А.В., Бондырев М.Л., Неклюдов С.А., Бреус, В.А., Бреус И.П. Органомодифицированные минералы – перспективные сорбенты для очистки газовойоздушных и водных сред, загрязненных углеводородами // Технологии нефти и газа. – 2012. – №. 1. – С. 3–14.
- РД 52.10.556–95. Определение загрязняющих веществ в пробах морских донных отложений и взвеси. – СПб.: Гидрометеониздат, 1996.
- Castro-Guijarro P.A., Álvarez-Vázquez E.R., Fernández-Espinosa A.J. A rapid Soxhlet and mini-SPE method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2021. – V. 413. – P. 2195–2206.
- Liang X., Zhu L., Zhuang S. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to soils enhanced by heavy metals: perspective of molecular interactions // Journal of soils and sediments. – 2016. – V. 16. – P. 1509–1518.
- Method 3550C, Ultrasonic Extraction, US Government Printing Office, Washington, DC. – 2007.
- Mukhopadhyay S., Dutta R., Das P. A critical review on plant biomonitors for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in air through solvent extraction techniques // Chemosphere. – 2020. – V. 251. – P. 126441.
- Soursou V., Campo J., Picó Y. Revisiting the analytical determination of PAHs in environmental samples: An update on recent advances // Trends in Environmental Analytical Chemistry. – 2023. – V. 37. – P. e00195.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, DC: Office of Research and Development, 2020. – URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/AtoZ.cfm (дата обращения: 2020–03–20).
- Wu L., Sun R., Li Y., Sun C. Sample preparation and analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment // Trends in Environmental Analytical Chemistry. – 2019. – V. 24. – P. e00074.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ БИОМАССЫ

А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, В.Г. Матвеева

Тверской Государственный Технический Университет, Тверь, Россия

Ежегодно только российский агропромышленный комплекс производит около 773 млн т отходов (260 млн т по сухому веществу). Из них 220 млн т (150 млн т по сухому веществу) приходится на растениеводство и 30 млн т (14 млн т по сухому веществу) – на отходы перерабатывающей промышленности. Отходы сельского хозяйства составляют 100–150 % объемов урожаев полевых культур, таких как сахарная свекла, помидоры, картофель, соя, пшеница, рис и другие зерновые культуры.

Самым большим препятствием для производства биотоплива из биотоплива второго поколения являются этапы предварительной обработки, которые необходимы для расщепления сложных полисахаридов, прежде чем они могут быть переработаны в биотопливо [1–2]. Большая часть целлюлозосодержащей биомассы, которая используется для производства биотоплива, состоит из сложных полисахаридов, таких как лигнин, целлюлоза и гемицеллюлоза. Лигноцеллюлозная биомасса подвергается биологическим, химическим или физическим методам расщепления исходной биомассы на более простые и короткие цепочки полисахаридов. Во многих случаях делигнификация также является основной целью первого этапа обработки. После того как целлюлоза и гемицеллюлоза разделены путем предварительной обработки, следующей важной задачей является ферментативный гидролиз этих полимеров. Этот метод второго цикла обработки для расщепления целлюлозы или полисахаридные цепи гемицеллюлозы с использованием многофункциональных ферментов также называется ферментативное осахаривание. Ферменты, такие как целлюлазы, используются для расщепления более коротких цепей полисахарида целлюлозы с образованием глюкозы. Затем эта глюкоза может быть подвергнута брожению с образованием биотоплива, такого как биоэтанол.

Одним из важнейших факторов при выборе непищевых культур для производства биотоплива является содержание в них целлюлозы. Различные культуры, которые специально выращиваются для производства биоэнергии, отбираются на основе высокого содержания целлюлозы. Биоэтанол получают из культур с низким содержанием лигнина и более высоким содержанием целлюлозы. Экологически благоприятным способом переработки биомассы является использование ферментов, которые разлагают целлюлозу до глюкозы. Три основных фермента («ферменты целлюлолитического комплекса») разлагающих целлюлозу, в совокупности известны как целлюлаза (CEL). Основная функция целлюлазы включают гидролиз полимерной целлюлозы до мономера глюкозы. Полная деградация молекулы целлюлозы будет достигнута за счет действия всех трех ферментов. Первым ферментом, участвующим в разложении целлюлозы, является эндоглюканаза (EG) (1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролазы; КФ 3.2.1.74), который случайным образом воздействует на гликозидные связи внутри молекулы целлюлозы. Восстанавливающие или не восстанавливающие концы целлюлозы затем дополнительно разлагаются экзоглюканазой (КФ 3.2.1.91 и КФ 3.2.1.74) с образованием либо целлобиозы, либо глюкозы. Полный процесс гидролиза не происходил без фермента β-глюкозидазы (BGL) (КФ 3.2.1.21), который действует на целлодекстрины и целлобиозу, полученные в результате предшествующих действий ферментов, и преобразуется в глюкозу.

Однако низкая термическая стабильность ферментов и стабильность при хранении, а также наличие примесей, утечка ферментов и проблема повторного использования являются основными недостатками использования свободных ферментов. Эти недостатки могут быть сведены к минимуму или даже устранены путем иммобилизации ферментов на различных носителях. Роль вспомогательных материалов заключается в сохранении вторичной структуры фермента, а также в создании благоприятных взаимодействий с ферментом. Выбор подходящего носителя также определяется типами фермента и процесса [3–5].

Мы считаем, что совместная иммобилизация множества ферментов (рисунок 1) на различных носителях является наиболее многообещающим направлением для будущей разработки нанобиокатализаторов.

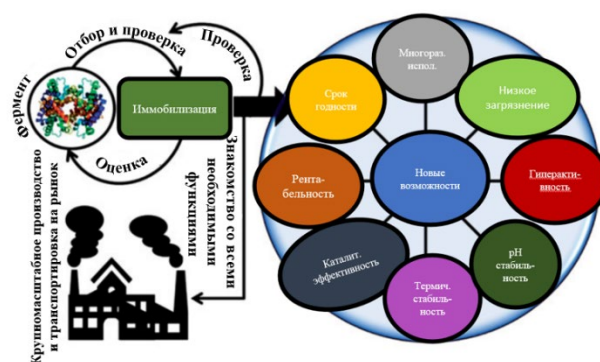


Рисунок 1 – Схематический путь скрининга ферментов к иммобилизации с новыми функциями для масштабирования до промышленного уровня

Это могло бы значительно улучшить результат осахаривания целлюлозы до сахаров или биоэтанола за счет эффективного гидролиза лигнина, крахмала и т. д., которые сопровождают целлюлозу в отходах биомассы и являются вредными для гидролиза целлюлозы. Кроме того, использование магнитно разделяемых подложек делает биокатализатор более надежным и облегчает биокаталитические процессы за счет извлечения магнитного нанобиокатализатора. Наконец, пути оптимизации контакта между иммобилизованной целлюлазой и целлюлозной биомассой с помощью реагирующих на стимулы материалов кажутся благоприятными для дальнейшей разработки нанобиокатализаторов для переработки целлюлозой биомассы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 24-79-10042).

Литература

- [1] Giannakopoulou, A.; Patila, M.; Spyrou, K.; Chalmpes, N.; Zarafeta, D.; Skretas, G.; Gournis, D.; Stamatis, H. Development of a four-enzyme magnetic nanobiocatalyst for multi-step cascade reactions. *Catalysts* 2019, 9, 995, doi : 10.3390/catal9120995.
- [2] Wang, Y.; Chen, D.; Wang, G.; Zhao, C.; Ma, Y.; Yang, W. Immobilization of cellulase on styrene/maleic anhydride copolymer nanoparticles with improved stability against pH changes. *Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)* 2018, 336, 152–159, doi : 10.1016/j.cej.2017.11.030.
- [3] Lu, L.; Zhang, L.; Yuan, L.; Zhu, T.; Chen, W.; Wang, G.; Wang, Q. Artificial Cellulosome Complex from the Self-Assembly of Ni-NTA-Functionalized Polymeric Micelles and Cellulases. *ChemBioChem* 2019, 20, 1394–1399, doi : 10.1002/cbic.201900061.
- [4] Saha, K.; Verma, P.; Sikder, J.; Chakraborty, S.; Curcio, S. Synthesis of chitosan-cellulase nanohybrid and immobilization on alginate beads for hydrolysis of ionic liquid pretreated sugarcane bagasse. *Renewable Energy* 2019, 133, 66–76, doi : 10.1016/j.renene.2018.10.014.
- [5] Sulman, A.M.; Matveeva, V.G.; Bronstein, L.M. Cellulase Immobilization on Nanostructured Supports for Biomass Waste Processing. *Nanomaterials* 2022, 12, 3796, doi : 10.3390/nano12213796.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПЛЕНОК ДЛЯ УПАКОВКИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

Б.Б. Тихонов, Д.Р. Лисичкин, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман, А.И. Сидоров

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия,

Хитозансодержащие материалы широко используются в качестве защитных упаковочных изделий пищевого назначения. На основе хитозана могут быть получены биосовместимые, нетоксичные, биodeградируемые пленочные материалы. Однако существует проблема получения влагостойких, водонерастворимых, достаточно прочных пленочных материалов на основе хитозана, обладающих при этом расширенной и повышенной антимикробной активностью и обеспечивающих пролонгированную защиту разнообразных пищевых продуктов от микробной загрязненности бактериями и грибами [1].

Одним из путей снижения набухаемости и растворимости, а также повышения прочности солевых хитозановых пленок является их термообработка в воздушной среде при температурах 90–120 °С. При термомодификации пленок с хитозаном в солевой форме повышается их водостойкость и прочность. Однако путем термообработки достичь полной водонерастворимости солевых хитозановых пленок не удается [2]. Вторым путем снижения набухаемости и растворимости, а также повышения прочности солевых хитозановых пленок является их химическая модификация, которая сводится к переводу хитозана в пленках из формы полисоли в форму полиоснования. В результате такой химической модификации удастся получить влагостойкие, полностью водонерастворимые и достаточно прочные пленки на основе хитозана, однако их антимикробная активность практически полностью исчезает [3].

Для получения образцов пленочного материала различной толщины хитозан (молекулярная масса около 400 КДа) растворяли в водном растворе уксусной кислоты или соляной кислоты фиксированной концентрации, интенсивно перемешивали смесь при температуре 20 ± 2 °С в течение 1 часа, формовали из смеси на чашке Петри образец пленочного материала, испаряли растворитель до образования пленочной структуры, после чего заливали образец пленочного материала 1М раствором NaOH, промывали дистиллированной водой до нейтрального pH, закрепляли на противоусадочном кольце и сушили при температуре 20 ± 2 °С в течение 24 часов до воздушно-сухого состояния. Высушенные пленки использовались для дальнейших исследований структурных, физико-механических, гидрофильно-гидрофобных свойств: толщину, влагопоглощение, водопоглощение, разрушающее напряжение и относительное удлинение при разрыве.

Толщину образцов пленочного материала измеряли микрометром с точностью 5 мкм и с помощью встроенной функции ИК Фурье спектрометра IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония).



Рисунок 1 – Синтезированный образец нерастворимой в воде хитозановой пленки

Степень поглощения образцами пленочного материала водяных паров (влагопоглощение) и воды (водопоглощение) определяли весовым методом по разности масс пленочного образца после и до его набухания в парах воды или в дистиллированной воде, соответственно. Взвешивание образцов проводили на электронных весах с точностью 10^{-4} г.

Упругопластические свойства образцов пленочного материала (разрушающее напряжение и относительное удлинение при разрыве) определяли на универсальной электромеханической испытательной машине согласно ГОСТ 14236–81. Для испытаний применяли образцы в форме прямоугольника шириной от 10 до 25 мм с длиной не менее 15 мм.

Структурные исследования выполняли методом ИК Фурье-спектроскопии на аппарате IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония). Перед снятием спектров образцы выдерживались в эксикаторе с влажностью 66 % (над нитратом натрия) при комнатной

температуре. Интерпретацию ИК-спектров поглощения и отражения проводили с использованием литературных данных по отнесению частот функциональных групп в спектрах соединений – аналогов.

Фотография, полученной нерастворимой в воде хитозановой пленки представлен на рисунке 1.

Из результатов экспериментов выявлено, что наиболее прочные и стабильные хитозановые пленки получаются при использовании 1 %-ного раствора хитозана в 0,2 Н уксусной кислоте при удельном объеме раствора 0,2 мл на 1 см² поверхности подложки. Характеристики оптимального образца пленки сведены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики оптимального образца упаковочной пленки

Удельный объем раствора, мл на см ² поверхности подложки	Общая характеристика образца	Толщина пленки, мкм	Влажность, %	Разрушающее напряжение при разрыве, МПа	Относительное удлинение при разрыве, %	Влагопоглощение, %	Водопоглощение, %
0,2	Пленка равномерная, прозрачная, прочная, легко отделяется от чашки Петри	101±5	12,0	120,1	3,6	41,6	116,0

Инфракрасные спектры оптимальных хитозановых пленок, полученных из растворов в соляной кислоте и уксусной кислоте, приведены на рисунке 2.

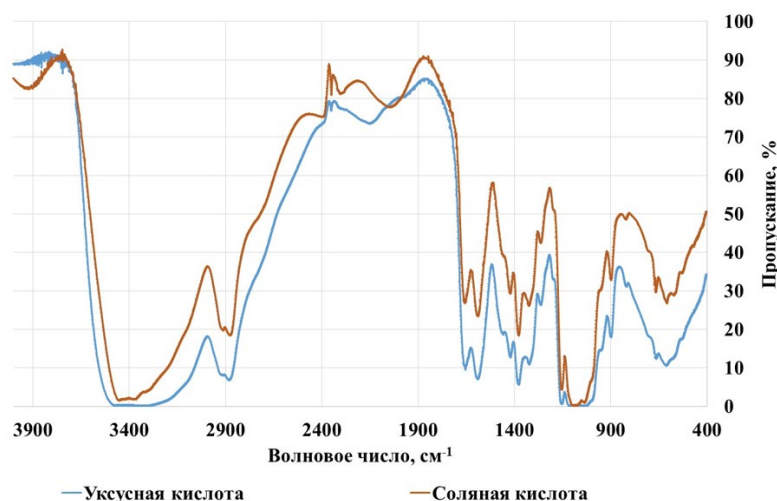


Рисунок 2 – Инфракрасные спектры образцов хитозановых пленок

Как видно из спектров на рисунке 2, оба спектра имеют схожие пики, отличающиеся только по интенсивности, что абсолютно логично, так как фактически хитозановые пленки представляют собой повторно переосажденный за счет сдвига значения pH в щелочную сторону хитозан, которому придана форма тонкодисперсной пленки толщиной 100–200 мкм.

Таким образом, на основе хитозана были получены прочные биodeградируемые пленки, отвечающие всем требованиям, предъявляемым к пищевым пленкам, которые могут быть использованы для защиты от повреждения и порчи целого ряда скоропортящихся пищевых продуктов, в том числе – мясных, рыбных и молочных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, проект № 075-15-2022-1232.

Литература

1. Шиповская А.Б. и др. Влияние наночастиц серебра на сорбционные и бактерицидные свойства пленок хитозана // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы девятой Международной конференции. – Ставрополь. – 2008. – С. 118–120.
2. Вихорева Г.А. и др. Свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. Материалы шестой Международной конференции. – Щелково. – 2001. – С. 14–16.
3. Руденко Д.А. Физико-химические основы модификации пленок хитозана: Дисс. канд. хим. наук – Саратов. – 2013. – 159 с.

ВЛИЯНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ ХВОЙНЫХ ЛЕСОВ

А.К. Квиткина¹, Н.С. Смирнов²

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

² Печоро-Илычский биосферный заповедник, с. Якша, Россия

За последние 25 лет площади лесов в мире сократились с 4128 млн га до 3999 млн га (ФАО, 2016), что чревато исчезновением естественных лесных экосистем и постепенным замещением их на вторичные леса и посадки. Травянистые растения лесного полога влияют на активность микробных сообществ подстилки и верхних горизонтов почвы, регулирующих процессы разложения органического вещества и высвобождения микро- и макроэлементов. При этом влияние биологического разнообразия растений вкупе с содержанием микроэлементов на активность микробной биомассы почвы в естественных лесных экосистемах почти не установлено. Изучение особенностей биологического круговорота естественных лесов, не утративших разнообразие растительного покрова, важно как для оценки запасов и потоков углерода в биосфере, так и для оценки биоразнообразия биосферные функции лесов в комплексе с почвами. Настоящее исследование направлено на установление взаимосвязи между биологической активностью почвы и видовым разнообразием растительного сообщества в уникальных еловых лесах Печоро-Илычского заповедника, что дополнит знания о роли растительности в микробных процессах.

Цель данного исследования – установить влияние видового разнообразия растительного сообщества на активность микробной биомассы почвы в еловых лесах Печоро-Илычского заповедника, а также уточнить связи этих показателей с химическими свойствами почв и подстилок.

Печоро-Илычский заповедник и национальный парк Югыд-ва вместе образуют массив «Девственные леса Коми», объект Всемирного природного и культурного наследия ЮНЕСКО. Еловые леса являются доминирующими и занимают 72 % от покрытой лесом территории заповедника.

Заповедник делится на три части: равнинную, предгорную и горную. Исследования проводились в предгорной части заповедника, в нижнем течении малой реки Большая Порожня (приток р. Печоры), 62–63° с.ш., 58–59° в.д., 250–400 м над ур. м. Особенностью данной территории является то, что на относительно небольшом предгорном участке наблюдается разнообразие очв. Ранее на данной территории исследована типология лесов и выделены 4 секции темнохвойных лесов: высокотравная, зеленомошная, сфагновая, крупнопоротниковая секция. Геоботанические описания, используемые в данной работе, выполнены Смирновым Н.С., Браславской Т.Ю., Квиткиной А.К., Смирновой О.В., описания почвы сделаны Семиколенных А.А. и др. На данных пробных площадях были отобраны образцы почвы и лесной подстилки из межкрупного пространства в бореально-высокотравном (3 обр.), мелкоотравно-зеленомошном (3 обр.), чернично-зеленомошном (3 обр.), кустарничково-долгомошном (4 обр.) и крупнопоротниковом (3 обр.) пихто-ельнике с кедром и березой (далее в тексте обозначены как «ельники»). Всего отобрано 16 образцов почвы и подстилки из межкрупного пространства.

Почву отделяли от подстилки, определяли влажность, рН, а также содержание углерода, азота и микроэлементов в сухом образце. Концентрации химических элементов измеряли рентгенфлуоресцентным методом в пересчете на MgO, P₂O₅, Al₂O₃, K₂O, CaO, TiO₂, MnO, Fe₂O₃, а также S. Во влажных образцах верхнего слоя почвы 0–5 см в лабораторных условиях определяли микробное дыхание (базальное дыхание почв) и микробную биомассу. Для этого влажную почву предварительно инкубировали при 22 °С. Концентрацию углекислого газа измеряли на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000». Скорость выделения углекислого газа почвенными микроорганизмами определяли по формуле:

$$R = (\%CO_2\text{почв.} - \%CO_2\text{возд.}) \times V \times 12 \times 60 / 1000 / 100 / 22,4 / m / t, \quad (1)$$

где R – скорость базального дыхания, мкг С/(г почвы×час); %CO₂ – концентрация углекислого газа во флаконе, %; V – объем флакона, мл; m – масса абсолютно сухой почвы, г; t – время накопления CO₂, мин. Микробную биомассу определяли методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД, мкг С/(г почвы×час)), которое рассчитывали по формуле (1), измеряя выделение CO₂ после внесения раствора глюкозы 10 мкг/г сухой почвы. Микробную биомассу (Смик, углерод микробной биомассы, мкг/г сухой почвы), рассчитывали по формуле: Смик = 56×СИД + 0,37.

Измерения образцов проведены в трех аналитических повторностях. Расчеты проведены в Excel и STATISTICA, далее указаны средние значения и ошибки среднего. Геоботанических данных обработаны с помощью программы PC-ORD методом NMS.

Результаты. Всего на исследуемой территории было обнаружено 111 видов растений, относящихся к ярусам А, В, С, D (древесный ярус, второй ярус, травянистый ярус, моховой покров). Видовое разнообразие снижалось в ряду: бореально-высокотравное, мелкотравно-зеленомошное, кустарничково-долгомошное, чернично-зеленомошное, крупнопоротниковое сообщество. Среднее число видов на данных площадках (с учетом ярусов А, В, С, D): 54,3–34,0–30,3–27,0–24,7. Для травянистого яруса (С) на данных площадках: 37,7–23,3–20,5–20,5–14,0. При этом только бореальное высокотравье достоверно отличалось от всех высокой видовой насыщенностью, отличия между остальными сообществами на уровне тенденций.

Показатели биологической активности почв характеризовали высокую степень разнородности естественных участков. Микробное дыхание между сообществами не различалось и варьировало от $1,73 \pm 0,7$ мкг С/г почвы в час в кустарничково-долгомошном сообществе до $1,1 \pm 0,5$ мкг С/г почвы в час в крупнопоротниковом сообществе.

Микробная биомасса выявила тенденцию снижения в ряду: мелкотравно-зеленомошный (796 ± 181) $\geq$ бореально -высокотравный (779 ± 154) $>$ кустарничково-долгомошный (508 ± 129) $>$ чернично-зеленомошный (489 ± 106) $>$ крупнопоротниковый ельник (372 ± 92) мкг С/г сухой почвы. По мере уменьшения микробной биомассы можно выделить две группы сообществ – высокоактивные: мелкотравно-зеленомошный и бореально-высокотравный ельник, и слабоактивные: кустарничково-долгомошный, чернично-зеленомошный, крупнопоротниковый ельник. При этом зависимости между содержанием органического и микробного углерода в верхнем горизонте почвы разных типов напочвенного покрова хвойных лесов Печоро-Илычского заповедника не обнаружено (таблица 1).

Таблица 1. Химические и биологические свойства верхнего горизонта (0–5 см) почвы

Напочвенный покров	С орг, %	Н общ, %	С/Н	Смик, мкг/г почвы
Бореально-высокотравный	6,24	0,51	14,3	779
Мелкотравно-зеленомошный	3,56	0,24	17,3	796
Кустарничково-долгомошный	4,06	0,22	21,5	508
Чернично-зеленомошный	3,62	0,17	24,8	489
Крупнопоротниковый	3,86	0,26	17,3	372

Обнаружена корреляция между средним содержанием микробной биомассы в почве и видовой насыщенностью как в сообществе, так и отдельно в травянистом ярусе (рис. 1). Наиболее высокой микробной биомассой отличались ельники с наибольшим видовым богатством: бореально-высокотравный и мелкотравно-зеленомошный.

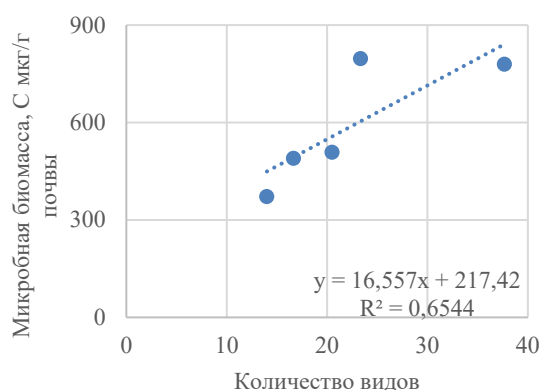


Рис. 1. Связь микробной биомассы с количеством видов растений в ярусе С (n = 5), рассчитанная по средним данным

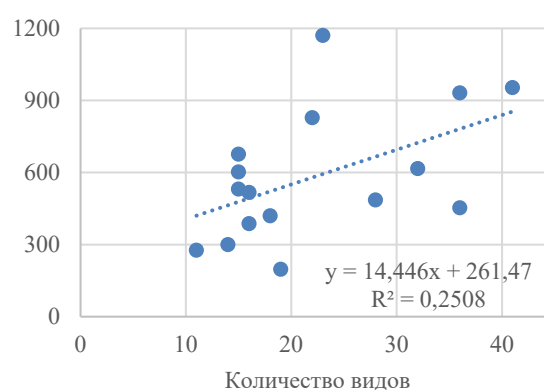


Рис. 2. Связь микробной биомассы с количеством видов растений в ярусе С (n = 16)

Сфагновая секция включала среднее количество видов и характеризовалась средними показателями микробиологической активности. Наиболее низкими значениями содержания микробной биомассы и низким количеством видов отличались крупнопоротниковый и чернично-зеленомошный ельник (рис. 1). Зависимость микробной биомассы от количества травянистых видов в сложных лесных сообществах имеет вид $y = 16,6 \times x + 217$ ($R^2 = 0,65$). Однако такая сильная связь наблюдалась только при сравнении средних величин для сообществ. Корреляция содержания микробной биомассы и числа видов на отдельных площадках ниже ($r^2 = 0,251$) (рис. 2). Зависимость микробной биомассы от числа видов при сравнении не усредненных данных, а отдельных площадок имела вид $y = 14,45 \times x + 261,5$ ($R^2 = 0,251$).

Типы сообществ отличались между собой видовым разнообразием напочвенного покрова, и, как следствие, содержанием элементов в подстилке. В подстилке богатого видами бореально-высокотравного пихто-ельника наблюдали наибольшее содержание кальция, и минимальное содержание кремния. В подстилке бедного видами крупнопоротникового леса было наибольшее содержание Al, Si, K, Ti. В подстилке богатого видами мелкотравно-зеленомошного леса наблюдали максимальное содержание Mg, Mn, Fe и много Ca, K, Al. В подстилке бедного видами долгомошного леса наблюдали довольно большое содержание P и Fe и низкое содержание Mg, Ti. В подстилке бедного видами чернично-зеленомошного леса наблюдали наименьшее содержание Fe, Ti, K, Si, Al, Mg.

Во всех пяти изученных сообществах наблюдалось накопление серы, фосфора, кальция преимущественно в подстилке по сравнению с почвой. В тоже время в почве, по сравнению с подстилкой, наблюдалось накопление магния, алюминия, кремния, титана, калия и железа. Преобладание содержания марганца в почве или подстилке зависело от типа растительного сообщества. В бореально-высокотравном пихто-ельнике содержание марганца в почве в 2 раза превышало его содержание в подстилке. В крупнопоротниковом лесу содержание марганца преобладало то в подстилке, то в почве. В других типах леса содержание марганца в подстилке преобладало над почвой. Наибольшее содержание серы, фосфора, кальция и магния в почве характерно для бореально-высокотравного сообщества. В подстилке эти различия, в основном, сохраняются. Наименьшее содержание S, P, K в почве характерно для чернично-зеленомошного и мелкотравно-зеленомошного леса. Наибольшее содержание кремния и титана, и наименьшее содержание железа в почве характерно для чернично-зеленомошного сообщества. Наибольшее содержание алюминия, калия, железа наблюдалось в почве крупнопоротниковой секции.

Выводы. Результаты анализа показали наличие положительной корреляции между видовым богатством растительного сообщества и показателями микробной активности почвы. Наименьшие значения базального дыхания и содержания микробной биомассы были зафиксированы в крупнопоротниковой секции, характеризующейся низким видовым разнообразием. В то же время наивысшие значения микробной биомассы и дыхательной активности были зарегистрированы в бореально-высокотравной и мелкотравно-зеленомошной подсекциях, обладающих максимальным видовым богатством. Интересно, что зеленомошная секция делилась на высокоактивную мелкотравно-зеленомошную и низкоактивную кустарничково-зеленомошную подсекции, показывающие схожие биологические активности с кустарничково-долгомошной.

Микробная активность была приурочена к увеличению pH и накоплению Ca, Mg, S, P и снижению содержания Si, Ti как в лесной подстилке, так и в почве.

В ходе исследования было установлено, что биологическая активность микробной биомассы верхней части почвы в еловых лесах Печоро-Илычского заповедника снижается с уменьшением видового разнообразия растительного сообщества и увеличивается с его возрастанием. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что высокое видовое разнообразие способствует улучшению микробной активности, тем самым играя важную роль в поддержании экосистемных процессов. Результаты работы могут быть полезны для дальнейших исследований в области экологии и охраны окружающей среды, а также для повышения эффективности управления природными ресурсами.

Работа выполнена в рамках реализации важнейшего инновационного проекта государственного значения «Разработка системы наземного и дистанционного мониторинга пулов углерода и потоков парниковых газов на территории Российской Федерации, обеспечение создания системы учета данных о потоках климатически активных веществ и бюджета углерода в лесах и других наземных экологических системах» (рег. № 123030300031–6).

Литература

Бобкова К.С., Галенко Э.П., Загирова С.В., Патов А.И., Сенькина С.Н., Машика А.В. Коренные еловые леса предгорного ландшафтного района Печоро-Илычского заповедника // Труды Печоро-Илычского заповедника. Сыктывкар. 2005. Вып. 14. С. 19–24.

Восточноевропейские леса: история в голоцене и современность. М.: Наука, 2004. Кн.1. 479 с.; Кн. 2. 575 с.

Луговая Д.Л., Смирнова О.В., Запрудина М.В. и др. Микромозаичная организация и фитомасса напочвенного покрова в основных типах темнохвойных лесов Печоро-Илычского заповедника // Экология. № 1. 2013. С. 3–10.

Семиколенных А.А., Бовкунов А.Д., Алейников А.А. Почвы и почвенный покров таежного пояса Северного Урала (верховья реки Печора) // Почвоведение. 2013. № 8. С. 911–923.

Смирнов Н.С. Типологическое и видовое разнообразие темнохвойных лесов нижнего течения реки Б. Порожня (приток р. Печоры, Печоро-Илычский заповедник) // Экология. 2013. № 1. С. 30–38.

Смирнова О.В., Алейников А.А., Смирнов Н.С., Луговая Д.Л. Пионовая тайга // Природа. 2014. № 2. С. 54–63.

УДК 614.8

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-2-57-58>

АНАЛИЗ ПРЕДОТВРАЩЕННОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО УЩЕРБА ВСЛЕДСТВИЕ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРЕНИЯ КРС

Н.В. Малков, Н.А. Политаева

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Крупный рогатый скот (КРС) является источником выбросов в атмосферу значительных количеств метана (CH₄). Парниковый потенциал метана примерно в 25 раз выше, чем у углекислого газа [1–3]. Согласно литературным данным, быки и телята производят порядка 60 кг метана в год или 160 г/гол/сут. Интенсивность производства метана меняется со временем. Бычки в 6 месяцев производят порядка 50 г/гол/сут, к 12-ти месяцам этот показатель достигает 250–300 г/гол/сут [4]. При изучении влияния на пищеварение быков кормовой добавки на основе растворимых пищевых волокон (торг. название «ПОЛИС») нами был получен достоверный результат по увеличению среднесуточного привеса у 7-ми и 11-ти месячных животных на 20 % в расчете на один месяц, что соответствовало увеличению живой массы животных на 3 % относительно контроля. На основании полученных данных нами был произведен теоретический расчет, что в случае последовательного применения такой схемы кормления в течение 3 месяцев, кумулятивное увеличение массы составит порядка 10 % относительно контроля. Это позволяет сократить выращивание в среднем на 30–35 дней при продолжительности выращивания 10–12 месяцев. Целью данной работы является проведение теоретического анализа величины предотвращенного экологического ущерба от загрязнения атмосферного воздуха метаном при применении описанной выше технологии. Рассмотрим вариант, при котором быки выращиваются до 10-ти месячного возраста. В таком случае применение растворимых пищевых волокон позволит выйти на целевые показатели массы к 9-му месяцу. Известно, что в возрасте 9–10 месяцев быки производят порядка 200 грамм метана на голову в сутки.

Подсчитаем выбросы метана за месяц для типового поголовья в 400 голов (1) и переведем полученные данные по метану в CO₂ эквиваленты (2):

$$M_{мет\ 30} = N_{гол} \cdot M_{мет\ гол} \cdot 30 = 400 \cdot 0,2 \cdot 30 = 2400 \text{ кг} \quad (1)$$

$$M_{co2\ 30} = M_{мет\ 30} \cdot 25 = 2400 \cdot 25 = 60000 \text{ кг} \quad (2)$$

Теперь рассчитаем величину предотвращенного экологического ущерба от загрязнения атмосферного воздуха рассчитывается по формуле (3):

$$Y_{np}^a = Y_{уд}^a \cdot \sum_{K=1}^K M_{нк}^a \cdot K_э^a \quad (3)$$

где: $Y_{уд}^a$ – показатель удельного ущерба атмосферному воздуху (для Северо-Западного региона = 667,5 руб./усл. т); $M_{нк}^a$ – приведенная масса выбросов загрязняющих веществ, усл. тонн; K – количество объектов (предприятий, производств, имеющих ГОУ); $K_э^a$ – коэффициент экологической ситуации и экологической значимости состояния атмосферного воздуха (для Северо-Западного региона = 1,5).

Приведенная масса загрязняющих веществ рассчитывается по формуле 4:

$$M_{нк}^a = \sum_{i=1}^N m_i^a \cdot K_{эi}^a \quad (4)$$

где m_i^a – фактическая масса – го загрязняющего вещества, тонн; $K_{эi}^a$ – коэффициент относительной эколого-экономической опасности i-го загрязняющего вещества или группы веществ (0,4); i – индекс загрязняющего вещества или группы загрязняющих веществ; N – количество учитываемых групп загрязняющих веществ.

Приведенная масса для диоксида углерода:

$$M_{нк}^a = 60 \cdot 0,4 = 24 \text{ усл. тонн}$$

Величина предотвращенного экологического ущерба, рассчитанная по формуле 3:

$$Y_{np}^a = 667,5 \cdot 24 \cdot 1,5 = 24030 \text{ руб.}$$

Вывод: проведенный анализ показал, что увеличение эффективности пищеварения в течение 3 месяцев подряд позволяет сократить выбросы метана на типовой ферме по разведению быков в 400 голов и предотвратить экологический ущерб на сумму в 24030 р.

Литература

- [1] Myhre, g. et. al, in climate change 2013: the physical science basis (eds stocker, t.f. Et al.) 659–740 (ipcc, 30 cambridge univ. Press, 2013).
- [2] Hassouna, M. et. al, 2022: DATAMAN: a global database of methane, nitrous oxide, and ammonia emission factors for livestock housing and outdoor storage of manure. J. Environ. Qual. 52, 207–223.
- [3] Huws, S. et. al, 2018: Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. Frontiers in Microbiology. 9, 2161.
- [4] Kuhla, B. et. al, 2022: Enteric methane emission factors, total emissions and intensities from Germany's livestock in the late 19th century: A comparison with the today's emission rates and intensities. Science of The Total Environment. 848. 157754. 10.1016/j.scitotenv.2022.157754.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННОГО И ЭКЗОГЕННОГО МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА НА МИНЕРАЛИЗАЦИЮ И ГУМИФИКАЦИЮ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ

А.К. Квиткина

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, Россия

В связи с усилением антропогенного воздействия, актуальной становится оценка влияния соединений азота на процессы разложения органического вещества (ОВ) почв. Атмосферные выпадения минеральных форм азота в экосистемах вблизи крупных промышленных центров Европы, Северной Америки, Китая достигли 30–150 кг N на га в год, что сравнимо с внесением минеральных удобрений. Внесением минеральных форм азота в агроэкосистемы можно регулировать скорость и степень разложения растительных остатков (РО), а также эмиссию углекислого газа.

При рассмотрении процессов разложения растительных остатков мы предлагаем различать эндогенный и экзогенный азот. Эндогенный азот уже находится в растениях преимущественно в органической форме в составе аминокислот, амидов, аминсахаров и белков. Под экзогенным азотом мы понимаем азот, поступающий при разложении РО извне, – с удобрениями или с атмосферными осадками преимущественно в аммиачной и нитратной формах.

Цель работы – сравнение воздействия C:N за счёт эндогенного и экзогенного азота на разложение и гумификацию растительных остатков. В задачи исследования входили сравнительный анализ влияния эндогенного и экзогенного (аммонийного и нитратного) азота на скорость минерализации растительных остатков кукурузы в ряду снижения соотношения углерода к азоту от C:№ 62 до C:№ 22 и 10, и оценка индексов гумификации РО.

Для этого вырастили кукурузу при разных условиях азотного питания: обедненного (от 0 до 8.4 мг N/кг песка), нормального (84 мг N/кг песка) и обогащенного (от 168 до 672 мг N/кг песка) азотом питания. Получили кукурузу с разным накоплением органического и нитратного азота в листьях: C/№ 22, 34, 47 и 62. Листья измельчили, перемешали с песком и иллитом без добавления азота (опыт А). В опыте А изучали влияние эндогенного (минерального и органического) азота на разложение (варианты 22А, 32А, 47А, 62А). В опыте Б использовали растительные остатки с C/№ 62, к которым последовательно добавляли возрастающие количества NH_4NO_3 и доводили соотношение C/N до 47, 32, 22 и 10 (варианты 47Б, 34Б, 22Б, 10Б). В опыте В соотношение C/N регулировали внесением KNO_3 в исходные растительные остатки с C/№ 62 (варианты 47В, 22В). Длительность инкубации составила 365 сут (n=5 на начало эксперимента, n=3 по окончании (опыт с изъятием)).

Увеличение дозы азота при выращивании кукурузы привело к увеличению содержания всех форм эндогенного азота в фитомассе. Эндогенный азот нельзя отождествлять только с органической формой азота в противовес экзогенному минеральному азоту. Эндогенный азот в листьях кукурузы, выращенной при разных уровнях азотного питания, был представлен органической и минеральной формами (рис. 1).

Увеличение дозы азота, внесенного в песок при выращивании кукурузы, приводило к увеличению содержания всех форм азота в фитомассе. Концентрация нитратов выросла в наибольшей степени – с 0,04 до 0,94 %, аммонийного азота – с 0,008 до 0,033 %, органического азота – с 0,572 % до 0,982 %. По мере снижения соотношения C/N в листьях кукурузы в ряду C/№ 62–22 соотношение органической формы азота к минеральной в них уменьшалось от 12 до 1. В листьях кукурузы с C/№ 22 содержались равные количества органического и минерального азота. В опытах Б и В с экзогенным азотом общее содержание азота в пробах соответствовало его содержанию в опыте А, но при C/№ 22 и меньше минеральный азот в пробе преобладал над органическим (рис. 1).

Результаты. В лабораторных инкубационных экспериментах по разложению желтых сухих листьев кукурузы была установлена обратная зависимость кумулятивной эмиссии CO_2 от величины C/N на ранних стадиях разложения (в пределах 20 сут инкубации), нивелирующаяся со временем. Чем больше вносилось минерального азота, тем быстрее разлагались растительные остатки, и тем больше выделялось углекислого газа в атмосферу.

При разложении растительных остатков наибольшая скорость эмиссии CO_2 во всех трёх опытах наблюдалась в первые 30 сут инкубации. За это время минерализовалось около половины всего углерода, эмитированного за 365 сут инкубации. Минимальная скорость наблюдалась при разложении РО с C:№ 62 без внесения минерального азота. Наибольшая скорость разложения РО наблюдалась при C:№ 22 после внесения нитрата аммония (рис. 2).

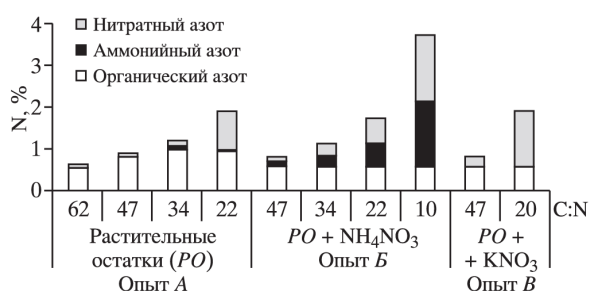


Рис. 1. Содержание органического, аммонийного и нитратного азота в растительных остатках (PO), % от сухой биомассы

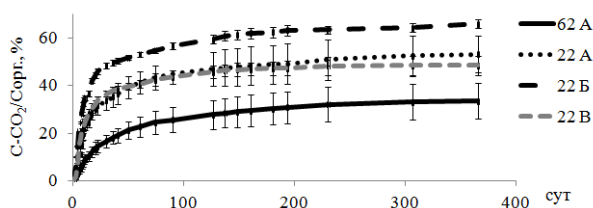


Рис. 2. Кумулятивные потери углерода, выраженные в % от внесённого углерода, при разложении исходных растительных остатков (С:№ 62, опыт А) и растительных остатков с С:№ 22: без добавления азота (22 А), с добавлением NH₄NO₃ (22 Б), с добавлением KNO₃ (22 В) за 365 сут

Величина C/N влияла на параметры двухпуловой модели разложения растительных остатков. Константы разложения лабильного пула углерода напрямую зависели от C/N в интервале от 22 до 62, но снижались под действием высоких доз экзогенного (C/№ 10) и эндогенного (C/№ 22) азота.

Минерализация растительного опада зависела не только от величины C/N, но и от источника, и формы доступного азота. Эндогенный азот, входящий в состав растений, и экзогенный, добавленный в виде NH₄NO₃ и KNO₃, действовали в одинаковом направлении, но эффект от экзогенного азота был выражен сильнее, чем от эндогенного, а от аммонийного сильнее, чем от нитратного.

Увеличение содержания эндогенного органического азота увеличивало константу разложения лабильного пула углерода (k₁). Экзогенный нитратный азот повышал как размер лабильного пула углерода (A₁), так и константу его разложения (k₁). Внесение NH₄NO₃ воздействовало на все параметры модели, описывающей деструкцию растительных остатков. Увеличение концентрации аммонийного азота приводило к ускорению разложения не только лабильного, но и устойчивого пула углерода растительных остатков.

Внесение аммонийной формы азота приводит к максимальному преобразованию РО, накоплению ароматического и алифатического углерода в продуктах трансформации, и высоким индексам гумификации: алкил / Оалкил 0,51 и арил/О-алкил 0,23.

Таким образом, источник азота (эндогенный или экзогенный), форма, в которой азот поступает в почву и включается в процесс деструкции опада (органическая, нитратная, аммонийная формы) и C/N оказывают влияние на константы минерализации углерода, размер его лабильного пула и качественный состав продуктов гумификации РО кукурузы. В известных из литературы моделях углеродного цикла влияние всех форм азота на интенсивность минерализации растительного опада предполагается одинаковым. По результатам настоящего исследования, влияние формы и источника азота, наряду с его количеством и C/N, должно учитываться в математических моделях, описывающих разложение РО.

Подобные исследования важны при прогнозировании влияния антропогенных изменений на размеры продуцирования диоксида углерода, а также на количественное и качественное состояние органического вещества почв естественных и агроэкосистем.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках госзадания № 122040500037-6 «Комплексное исследование влияния природных и антропогенных факторов на состояние почвенных предшественников, источников и стоков парниковых газов, включая моделирование структурно-функциональной организации биогенных циклов и факторов разномасштабной динамики наземных экосистем в условиях изменяющейся среды»

МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩИЕ И АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СУПЕРНАТАНТОВ ИЗ ТОМАТОВ МЕСТНЫХ СОРТОВ

А.В. Гребенищikov, А.Е. Чусова, В.А. Иванова, А.А. Пронькина

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Аллергия на томаты вызывается реакцией иммунной системы, известной как гиперчувствительность 1-го типа. Гиперчувствительность 1-го типа вызывает немедленную реакцию на аллерген. Воздействие пищевого аллергена провоцирует перекрестное связывание иммуноглобулина Е (IgE), что приводит к каскаду реакций, в результате которых высвобождается гистамин. Фруктаны, содержащиеся в помидорах, могут вызывать неприятные симптомы со стороны пищеварительной системы у людей. Реакции OAS на помидоры могут быть спровоцированы аллергией на пыльцу трав, которая перекрестно реагирует с помидорами. В этой ситуации образуются белки, известные как профилины. Профилины, хотя и не идентичны, достаточно близки, чтобы потенциально вызвать аллергическую реакцию.

В связи с потенциальной возможностью аутоиммунных процессов при использовании напитков на основе супернатантов, одним из этапов работ было исследование местно-раздражающих и аллергенных свойств экспериментальных супернатантов из томатов сортов Волгоградский, Оранж и Чёрный принц. Результаты исследования раздражающих свойств супернатантов показали, что нанесение их на кожу ежедневно в течение 15 суток не вызывало у кроликов изменений кожного покрова. Не отмечено покраснения кожи, утолщения кожной складки и выпадения подстриженной шерсти и шерсти, граничащей с выстриженными участками. При пальпации выстриженных участков кожи не наблюдали болезненной реакции у животных. Данные гематологических показателей свидетельствуют, что нанесение супернатантов на выстриженные участки кожи кроликов в течение 15 суток не изменяло клиническую картину крови экспериментальных животных. Опыт по изучению раздражающих свойств супернатантов на слизистые оболочки глаз провели на 9 кроликах.

Раздражающее действие супернатантов на слизистые оболочки глаз определяли по «глазной пробе». В конъюнктивальный мешок левого глаза 5 кроликам закапывали 1–2 капли супернатантов, а в конъюнктивальный мешок правого – 1–2 капли воды. За животными вели наблюдение на протяжении 15 суток. Оценку раздражающего действия проводили через 1; 2; 3; 4 и 24 часа, 3–7 и 15 суток визуально по изменению кровенаполнения конъюнктивы, наличию лакримации и состоянию роговицы по 10 бальной системе согласно таблице 3. Через 1 час после введения супернатантов у всех подопытных животных наблюдали слезотечение и выраженную гиперемию конъюнктивы с оценкой 4 балла. Через 2; 3 и 4 часа конъюнктивала оставалась слабовыраженной в той же степени – 4 балла. Спустя 24 часа у всех кроликов на слизистой глаз имело место наличие лакримации и отека век (раздражающий эффект – умеренный). На 2 сутки отмечали ярко выраженную гиперемию и лакримацию (раздражающий эффект – умеренный). На 4-е сутки признаки раздражения слизистой глаз постепенно исчезали. На 7 сутки видимых изменений на слизистой оболочки глаз не наблюдали. Таким образом, было установлено, что испытуемые супернатанты обладают умеренным раздражающим эффектом на слизистые оболочки глаз в течение первых 2 суток.

При введении подопытным животным гистамина наблюдалась следующая реакция: возбуждение, частая дефекация, мочеиспускание, учащенное дыхание, судороги. Критерием оценки служило время от момента введения гистамина до момента бокового положения животных. Время наступления гистаминового шока у подопытных и контрольных животных находилось в близких пределах ($P > 0,05$). Не было отмечено укорочения периода наступления гистаминового шока при введении исследуемых супернатантов. Напитки не потенцировали эффекта гистамина и, следовательно, не проявляли алергизирующих свойств.

У подопытных морских свинок характер протекания гистаминового шока не отличался от такового у контрольных животных. Тест непрямого реакции дегрануляции тучных клеток крыс (РНДТК). Опыты по изучению аллергенных свойств по тесту «непрямого реакции дегрануляции тучных клеток» (РНДТК) показали, что при подкожном введении супернатантов на первые сутки после введения процент дегранулированных клеток не превышал десяти. На 5; 10 и 15 суток после введения напитков процент дегранулированных клеток находился в пределах от $4,8 \pm 0,2$ до $2,8 \pm 0,30$. Наибольший процент дегранулированных клеток наблюдался на первые сутки после введения, но и в эти сроки по количеству дегранулированных клеток реакция считалась отрицательной.

Таким образом, с использованием двух высокочувствительных тестов для определения аллергизирующей активности супернатантов – «гистаминового шока» и РНДТК – было установлено, что при подкожном пути введения все образцы не потенцирует влияние гистамина и не вызывает дегрануляции тучных клеток подопытных животных, выходящие за пределы установленных норм.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00217, <https://rscf.ru/project/23-26-00217/>

Литература

1. International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature: IUIS official list <http://www.allergen.org/List.htm> 2008
2. Le LQ, Mahler V, Lorenz Y, Scheurer S, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U. Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(5):1176–83
3. Westphal S, Kempf W, Foetisch K, Retzek M, Vieths S, Scheurer S. Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Acta allergologica* 2004; 59(5):526–32
4. Petersen A, Vieths S, Aulepp H, Schlaak M, Becker WM. Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(4):805–15
5. Tomassen MM, Barrett DM, van der Valk HC, Woltering EJ. Isolation and characterization of a tomato nonspecific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. *J Exp Bot* 2007; 58(5):1151–60
6. Le L Q, Lorenz Y, Scheurer S, Fötisch K, Enrique E, Bartra J, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U. Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotech J* 2006; 4(2):231–42

УДК 60.606

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-2-61-62-63>

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА СОСТАВА АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА *K. PNEUMONIAE*

А.В. Солдатенкова, Д.С. Мартынова, С.А. Лазарев, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Введение. Антигенный комплекс *K. pneumoniae* 204 является компонентом разрабатываемого лекарственного средства для профилактики бактериальных и вирусных инфекций на основе антигенов условно-патогенных бактерий, стимулирующих врожденный иммунитет.

Технологическая схема производства антигенного комплекса *K. pneumoniae* включает в себя выделение растворимых антигенов из культуральной жидкости, инактивированной гидроксиламином. Для выделения антигенов из культуральной жидкости после инактивации необходимо освободиться от нежелательных примесей: обломков клеток и самого инактивирующего агента. Для этого проводят центрифугирование, микрофильтрацию и ультрафильтрацию. Однако процесс удаления гидроксиламина ультрафильтрацией осложнен образованием слизистой пленки из капсулы микроба, которая, в свою очередь, не позволяет снизить его содержание в антигенсодержащей жидкости до допустимых значений. В настоящем исследовании наработаны и проанализированы антигенные комплексы *K. pneumoniae*, полученные с использованием на стадии ультрафильтрации различных отмывающих растворов (дистиллированной воды и буферных растворов на основе TrisHCl).

Цель работы – оценить эффективность использования отмывающих растворов (дистиллированной воды и буферных растворов на основе TrisHCl), применяемых для диафильтрации, и их влияние на специфическую активность, а также химический состав получаемых антигенных комплексов *K. pneumoniae* 204.

Материалы и методы. Ампулу с высушенной культурой *K. pneumoniae* 204 высевали на пробирки с жидкой питательной средой и подращивали в течение 4 часов при температуре 37 °С, затем высевали на чашки петри с плотной питательной средой и выращивали в течение 18 ± 2 ч при тех же условиях. Выросшую культуру пересевали на матрасы с плотной питательной средой и выращивали в течение ночи. Через 18 ± 2 ч культуру смывали с агаризованной среды физиологическим раствором, микроскопировали и засевали в 2 ферментёра с 9 литрами питательной среды. Культивирование проводили в ферментёрах ФА 10 (Проинтех, Россия), контролируя температуру, pH, аэрацию и концентрацию микробных клеток. Состав питательной среды подобран в предварительных экспериментах и включал в себя фосфатные соли натрия, панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт и глюкозу.

Биомассу после культивирования собирали методом центрифугирования и разводили в дистиллированной воде до концентрации 20 млрд микробных клеток в 1 мл. Для определения концентрации микробных клеток использовали ОСО мутности. Полученную суспензию инактивировали гидроксиламином в течение 60 ± 2 ч при температуре 48 ± 1 °С.

После инактивации обломки разрушенных микробных клеток из антигенсодержащей жидкости удаляли методом центрифугирования или микрофильтрацией. Удаление гидроксиламина из антигенсодержащей жидкости проводили ультрафильтрацией в режиме диафильтрации на установке Cobetter (Китай) с использованием мембран с уровнем отсечения 10 кДа. Диафильтрацию проводили дистиллированной водой или буферными растворами, содержащими от 10 до 50 мМоль Tris-HCl (pH = 9,0).

Полученные таким образом антигенные комплексы лиофильно высушивали и оценивали по следующим показателям: содержание остаточного гидроксиламина (колориметрический метод), общего белка (метод Лоури), углеводов (метод с антроновым реактивом), нуклеиновых кислот (метод Спирина), специфическая активность (РТПГА).

Результаты. Проведено 14 циклов культивирования в ферментере, культуральные жидкости после культивирования собирали и очищали от гидроксиламина методом ультрафильтрации в режиме диафильтрации с использованием буферных растворов Tris-HCl с концентрацией от 10 до 50 мМоль в сравнении с дистиллированной водой.

Всего получены семнадцать образцов антигенного комплекса: три образца с использованием в качестве отмывающего раствора для диафильтрации дистиллированной воды, три образца – 50 мМоль с использованием Tris-HCl; три образца – 25 мМоль Tris-HCl; восемь образцов – с использованием 10 мМоль Tris-HCl.

Для проведения дальнейших исследований лиофильно высушенные варианты антигенных комплексов растворяли в дистиллированной воде до концентрации 1 мг/мл.

Минимальная тормозящая доза антигенов в РТПГА соответствовала нормативным значениям для всех полученных вариантов.

Полученные образцы проанализированы на содержание остаточного гидроксиламина. У всех вариантов очищенных с помощью буферных растворов на основе Tris-HCl содержание гидроксиламина снизилось до допустимых значений (менее 1 мкг/мг), у образцов, очищенных с помощью дистиллированной воды не удалось провести эффективный процесс диафильтрации и достичь снижения гидроксиламина до требуемых значений.

Содержание общего белка в образцах варьировало от 3,4 до 5,1 %, полисахаридов от 41 до 57 %, нуклеиновых кислот – от 1,0 до 1,6 %. При этом между образцами, очищенными при помощи 10, 25 и 50 мМоль Tris-HCl статистически значимых различий в содержании белков, углеводов и нуклеиновых кислот обнаружено не было, что позволяет выбрать наименьшую концентрацию Tris-HCl для получения антигенных комплексов *K. pneumonia* 204 в процессе производства разрабатываемого лекарственного средства.

Таким образом проведенные исследования показали, что добавление Tris-HCl в отмывающий раствор для диафильтрации в процессе получения антигенного комплекса *K. pneumonia* 204 повышает эффективность диафильтрации и позволяет снизить содержание гидроксиламина до допустимых значений и не влияет на специфическую активность, содержание белка, углеводов и нуклеиновых кислот в конечном антигене.

Литература

1. Патент RU 2799527 C1, Способ получения поликомпонентной вакцины на основе антигенов условно-патогенных микроорганизмов, Михайлова Н.А., Солдатенкова А.В., Грубер И.М., Курбатова Е.А., Свитич О.А., Зверев В.В., Лазарев С.А., Асташкина Е.А., номер заявки: 2022127426, дата регистрации: 21.10.2022, дата публикации: 05.07.2023 г., Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова"



Уважаемые коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам XII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» за ваш труд в определении основных проблем в области биотехнологии и выявлении тенденций развития в данной области, за обмен достижениями биотехнологии и обсуждение путей оптимизации образовательного процесса студентов-биотехнологов. Желаем вам творческих успехов, больших научных достижений и побед!

До новых встреч!
С уважением, оргкомитет.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
журнала «Актуальная биотехнология»

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

1. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

1.5. Биологические науки

1.5.4. Биохимия

1.5.6. Биотехнология

1.5.7. Генетика

1.5.11. Микробиология

1.5.15. Экология

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

2.7. Биотехнологии

2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ

4. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

4.3. Агроинженерия и пищевые технологии

4.3.3. Пищевые системы

Требования к оформлению статей

1. Материалы представляются в двух видах: на электронном носителе и распечатанные на одной стороне листа белой бумаги формата А4 (1 экз.) на лазерном принтере. Они должны быть набраны в редакторе MSWord версия не ниже 6.0 (Office не выше 2007) и напечатаны через одинарный интервал в две колонки шрифтом:

- основной текст – TimesNewRomanCyr 11 с полями: левое 22 мм, правое 18 мм, верхнее и нижнее 25 мм;
- колонтитулы от края – верхний и нижний 18 мм;
- заголовки по центру – TimesNewRomanCyr 11, жирный;
- красная строка -1 см;
- перенос слов – автоматический.

Со смещением на 5 см от рамки текста в начале статьи набираются:

- УДК– Times New Roman Cyr 12;
- должность, степень И. О. Ф. авторов – TimesNewRomanCyr 12;
- название статьи – TimesNewRomanCyr 16, жирный, строчной (без переноса);
- аннотации– Times New Roman Cyr 9;
- ключевые слова – TimesNewRomanCyr 9, до 10 слов;

2. Объем для статьи – 3-8 с. Структурно статья должна иметь четко выраженное *введение*, в котором ставится задача (описывается решаемая проблема), *основную часть*, где излагаются используемые авторами пути решения поставленной задачи, приводятся и обсуждаются результаты, и *заключение*, в сжатой форме подводящее итог работы. Повторение одних и тех же данных в статье, таблице и графике не допускается. Размерность всех характеристик приводится в системе СИ.

3. К каждой статье под заглавием дается аннотация (объем до 600 печатных знаков) на русском и английском языках через 1 строку друг от друга. Название статьи, фамилия и инициалы приводятся отдельно на английском языке.

4. Название статьи или краткого сообщения должно быть лаконичным и точно отражать содержание.

5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:

должны быть расположены после ссылки на них в тексте;

должны выполняться на компьютере с обозначением всех необходимых букв и символов в соответствии с ЕСКД и Р 50-77-80. Все буквенные и цифровые обозначения, приведенные на рисунках, поясняются в основном или подрисуночном тексте. Подрисуночные подписи даются TimesNewCyr 10, на формат рисунка.

Графические объекты (диаграммы, графики) должны быть активными (т.е. подлежать редактированию стандартными средствами, например, MSExcel).

6. Формулы и буквенные обозначения:

- × буквы латинского алфавита, используемые в индексах, набирают курсивом;
- × буквы русского и греческого алфавита – прямым шрифтом; знак вектора – полужирным;
- × нумерация формул в тексте сквозная. Нумеруются только те формулы, на которые есть ссылки в тексте.

Формат формул (стандартный редактор) :

× стиль – «математический»;

× размер символа — 11

Sizes (Размеры)	
Full (Обычный)	11 – 10
Subscript/Superscript (Крупный индекс)	7
Sub-subscript/Superscript (Мелкий индекс)	5
Symbol (Крупный символ)	12
Subsymbol (Мелкий символ)	9

7. Таблицы (слово печатается вразрядку) должны быть с заголовками и обязательно располагаться после ссылки на них в тексте. Графы в таблицах должны иметь краткие заголовки. Упоминаемые в заголовках величины сопровождаются соответствующими единицами измерений.

8. Литература (слово печатается: TimesNewRomanCyr 11, жирный, прописной) включает источники, использованные автором при написании статьи, и должна содержать не более 10 наименований. Ссылки в тексте даются в квадратных скобках: [1], помещаются в конце статьи и оформляются согласно ГОСТ 7.1-2003.

В журнале публикуются оригинальные научные статьи теоретического и экспериментального характера. Автор указывает рубрику (в сопроводительном письме), в которой он хотел бы разместить свою статью:

Статья должна быть тщательно проверена и подписана всеми авторами.

На отдельном листе авторы указывают название статьи на русском и английском языке, ФИО полностью, адрес, ученую степень, должность, место работы, контактный телефон, e-mail, а также отмечают автора для переписки.

К статье должны прилагаться сопроводительные документы:

- сопроводительное письмо;
- выписка из протокола заседания кафедры (лаборатории) с рекомендацией статьи к печати;
- положительная рецензия ведущего ученого в данной области или члена редакционной коллегии, заверенная подписью и печатью.

•

