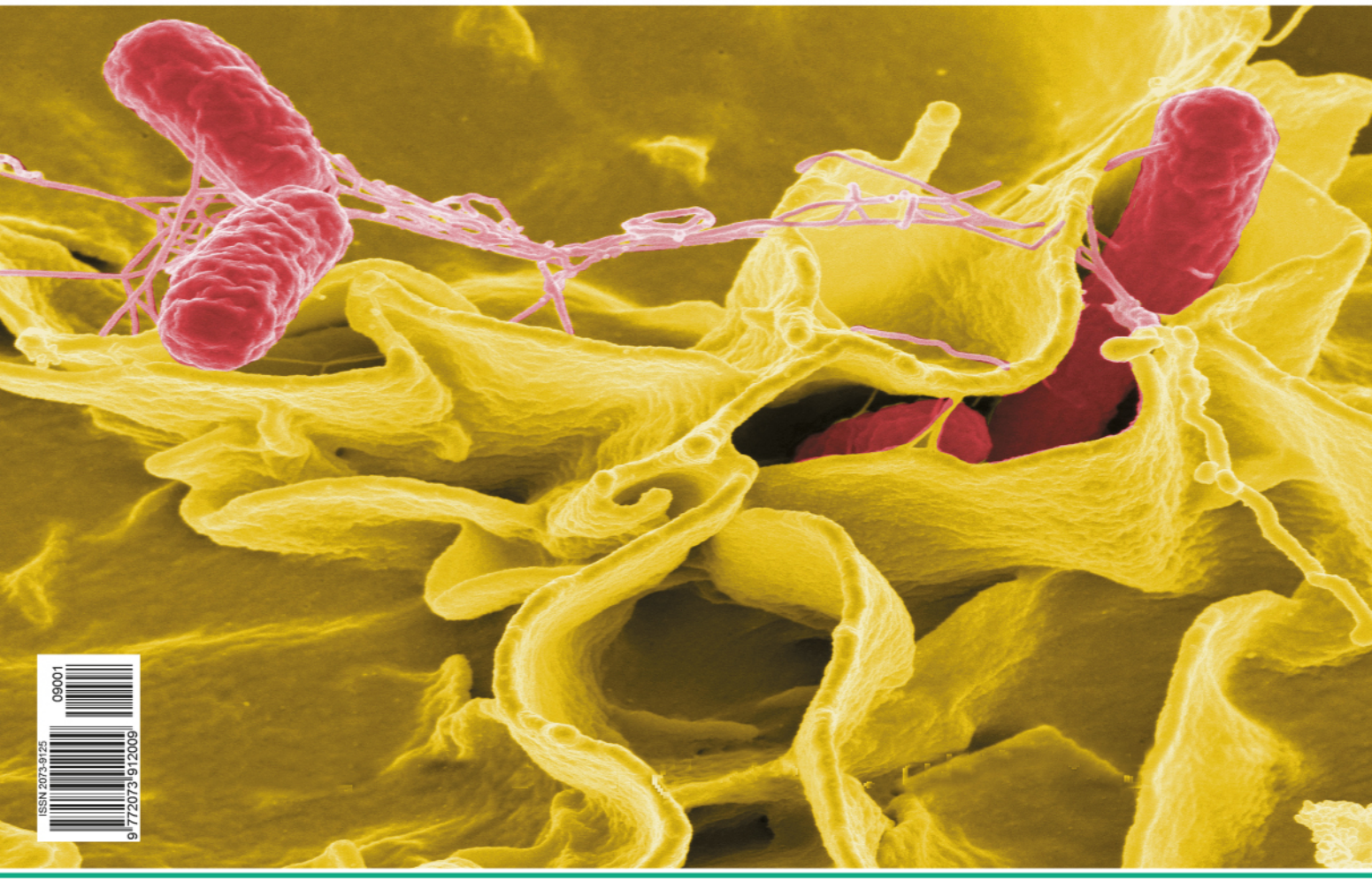
ВЕСТНИК УРАЛЬСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИЧЕСКОЙ НАУКИ



ISSN 2073-9125

Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии

4/1

Екатеринбург, 2011

СРЕДНЕ-УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
И ПРАВИТЕЛЬСТВА СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

№ 4/1 (38), 2011 г.

ВЕСТНИК УРАЛЬСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИЧЕСКОЙ НАУКИ

ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Главный редактор:
В.А. Черешнев, академик РАН и РАМН (г. Екатеринбург)

Заместители главного редактора:
В.Г. Климин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); С.М. Кутепов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);
Б.Г. Юшков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

Ответственный секретарь:
С.Л. Леонтьев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

Редакционная коллегия:
Н.А. Агаджанян, академик РАМН (г. Москва); Ф.И. Бадаев, д.м.н. (г. Екатеринбург);
А.Б. Блохин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); В.Н. Большаков, академик РАН (г. Екатеринбург);
О.В. Бухарин, член-корреспондент РАН, академик РАМН (г. Оренбург);
А.М. Дыгай, академик РАМН (г. Томск); В.Н. Журавлев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);
Н.В. Зайцева,член-корреспондент РАМН (г. Пермь); Ю.М. Захаров, академик РАМН (г. Челябинск);
О.П. Ковтун, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Новицкий В.В., академик РАМН (г. Томск);
М.И. Прудков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); К.В. Судаков, академик РАМН (г. Москва);
Р.М. Хаитов, академик РАМН (г. Москва); М.В. Черешнева, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);
В.И. Шевцов, член-корреспондент РАМН (г. Курган);
А.П. Ястребов, член-корреспондент РАМН (г. Екатеринбург)

Редакционный совет:
Я.Б. Бейкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.А. Белкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);
С.А. Берзин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Ф.Х. Камилов, д.м.н., профессор (г. Уфа);
Б.А. Кацнельсон, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Л.А. Ковальчук, д.б.н. (г. Екатеринбург);
С.А. Коротких, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); С.В. Кузьмин, д.м.н. (г. Екатеринбург);
Л.П. Ларионов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Г.И. Ронь, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);
С.В. Сазонов, д.м.н., профессор (г.Екатеринбург)

ЕКАТЕРИНБУРГ, 2011

Содержание

Фундаментальные проблемы современной биологии

Гончаренко А.В. Системы токсин-антитоксин у бактерий 9

Коробов В.П. Лантибиотики – природные антибиотики широкого спектра действия 10

Кудыкина Ю.К., Шлеева М.О., Капрельянц А.С. Покоящиеся формы микобактерий. Латентный туберкулез 11

Мулюкин А.Л. Способы выживания неспорообразующих бактерий 12

Сибгатуллина Э.Э., Зиганшин А.М. Способ утилизации послеспиртовой барды с использованием биогазовой технологии 13

Скородумова О.В. Современные подходы к патентованию объектов биотехнологии в Российской Федерации 14

Ткаченко А.Г. «Органы чувств» у микроорганизмов и механизмы проведения сигналов стресса 15

Эль-Регистан Г.И. Популяционные аспекты адаптации микроорганизмов 16

Экология и генетика микроорганизмов. Экологическая физиология бактерий

Ананьина Л.Н., Плотникова Е.Г. Новая система олигонуклеотидов для амплификации *ect*-генов бактерий семейства *Halomonadaceae* 17

Андрющенко С.В. Действие неспецифических модификаторов копийности плазмидной ДНК на антилизоцимную активность *Escherichia coli* 18

Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Роль полиаминов в адаптации *Escherichia coli* к действию фторхинолоновых антибиотиков 19

Белоногова Н.В., Колпаков А.И., Куриненко Б.М., Маргулис А.Б. Особенности развития стафилококковой инфекции при действии гомосеринлактона *in vivo* 20

Белоусова Е.В., Тутукина М.Н., Грабович М.Ю. Идентификация генов диссимиляционного серного метаболизма у *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* 21

Беляева П.Г. Особенности развития цианобактерий планктона Камского и Воткинского водохранилищ 22

Валышева И.В., Сычёва М.В. Молекулярно-генетическая характеристика цитолитической активности энтерококков 23

Васильченко А.С. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфофункциональной реакции бактерий на различные воздействия 24

Ву Тхи Лоан, Селиванова Н.В., Епринцев А.Т. Особенности функционирования сукцинатдегидрогеназы у *Sphaerotilus natans* д-507 при разных типах питания 25

Гимадеева Р.М., Бабынин Э.В., Маргулис А.Б. Цитотоксичность и генотоксичность новых производных фуранона 26

Голясная Н.В., Магданова Л.А., Цветкова Н.А., Гузачева И.М. Мутагенез стационарной фазы роста в *Pseudomonas aeruginosa* «small variant colony» 27

Грязева И.В., Давыдова О.К., Кузнецова Н.В. Влияние алкилоксибензолов на стрессовый ответ актериальных клеток, оцененный с использованием люминесцирующих тест-систем 28

Демидёнок О.И., Гончаренко А.В., Салина Е.Г., Капрельянц А.С. Бактериостатический эффект антибиотиков зависит от активности токсина VapC 29

Иркитова А.Н. Сравнительная оценка штаммов ацидофильной палочки для использования в составе пробиотических продуктов 30

Караваева Е.А., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Биопленкообразование – один из механизмов участия полиаминов в развитии антибиотикорезистентности природных штаммов *Escherichia coli* 31

Караваева О.А., Гулий О.И., Павлий С.А., Володин Д.Ю., Буров А.М., Игнатов О.В. Исследование бактериофага *Azospirillum brasilense* SP7 32

Катрецкая Г.Г., Морозова Н.С., Гулая О.А. Лабораторные аспекты применения антисептиков при внебольничных пневмониях 33

Козюкова К.В., Кузнецова М.В., Карпунина Т.И. Продукция оха-бета-лактамаз нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* 34

Корляков К.А., Арсентьева Н.Ю., Нохрин Д.Ю. Влияние сложности рельефа стекол на формирование монокультур микроорганизмов 35

Костеневич А.А., Сапунова Л.И., Черная А.Н., Черкасова Л.В. Гидролазная и трансгликозилазная активности бета-галактозидазы растущей культуры *Cryptococcus* species 36

Fundamental Problems of Modern Biology

Goncharenko A.V. Toxin – Antitoxin Systems of Bacteria 9

Korobov V.P. Lantibiotics are natural antibiotics of wide spectrum 10

Kudykina Yu. K., Shleeva M. O., Kaprelyants A. S. Dormant cells of mycobacteria. Latent tuberculosis 11

Mulyukin A.L. Survival of non-spore-forming bacteria: forms and mechanisms... 12

Sibgatullina E.E., Ziganshin A.M. The disposal distillery grains using biogas technology 13

Skorodumova O.V. Modern approaches to biotechnological objects patenting in russian federation 14

Tkachenko A.G. «Sense organs» in microorganisms and mechanisms of the stress signal transduction 15

El-Registan G.I. Adaptation of microorganisms: population aspects 16

Ecology and Genetics of Microorganisms. Ecological Physiology of Bacteria

Anan'ina L.N., Plotnikova E.G. A new primer system for amplification of *ect*-genes in bacteria of *Halomonadaceae* family 17

Andryuschenko S.V. Action of non-specific modifiers of plasmid DNA copy number on *Escherichia coli* anti-lyzozyme activity 18

Akhova A.V., Tkachenko A.G. Polyamines in *Escherichia coli* adaptation to fluoroquinolone antibiotics treatment 19

Belonogova N.V., Kolpakov A.I., Kurinenko B.M., Margulis A.B. Characteristics of staphylococcal infection under homoserine lactone treatment *in vivo* 20

Belousova E.V., Tutukina M. N., Grabovich M. Ju. Identification of the gene encoding for enzymes of dissimilatory sulfur metabolism in *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* 21

Belyaeva P.G. Developmental peculiarities of planktonic cyanobacteria from Kama and Votkinsk reservoirs 22

Valysheva I. V., Sycheva M. V. The molecular-genetic characterization of enterococci cytolytic activity 23

Vasilchenko A.S. Using of scanning probe microscopy to evaluate the morphofunctional response of bacterial cells to various impacts 24

Vu Thi Loan, Selivanova N.V., Eprintsev A.T. Peculiarities of functioning of succinate dehydrogenase from *Sphaerotilus natans* d-507 at different types of nutricient 25

Gimadeeva R.M., Babynin E.V., Margulis A.B. Cytotoxicity and genotoxicity of new furanone derivatives 26

Goljasnaja N.V., Magdanova L.A., Tsvetkova N.A., Guzacheva I.M. Mutagenesis of the stationary growth phase in *Pseudomonas aeruginosa* «small variant colony» 27

Gryazeva I.V., Davydova O.K., Kuznetsova N.V. Influence of alkylhydroxybenzenes on the stress response of bacterial cellsestimated using luminescent test-systems . 28

Demidenok O.I., Goncharenko A.V., Salina E.G., Kaprelyants A.S. Bacteria static effect of antibiotics depends on toxin VapC activity 29

Irkitova A.N. Comparative estimation of the acidophilic rod strains for the use as a part of probiotic products 30

Karavaeva E.A., Nesterova L.Yu., Tkachenko A.G. Biofilm formation is one of the antibiotic resistance mechanisms regulated by polyamines in *Escherichia coli* isolates 31

Karavaeva O.A., Guliy O.I., Pavliy S.A., Volodin D.Yu., Burov A.M., Ignatov O.V. A bacteriophage from *Azospirillum brasilense* SP7 32

Katretskaya G.G., Morozova N.S., Gulaya O.A. Laboratory aspects of using antiseptics in community-acquired pneumonias 33

Kozjukova K.V., Kuznetsova M.V., Karpunina T.I. Production oxa-beta-lactamases of nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* 34

Korlyakov K.A., Arsentyeva N.Y., Nohrin D.Y. Influence of glass relief on the formation of microbial monocultures 35

Kastsianevich A.A., Sapunova L.I., Chornaya A.M., Cherkasova L.V. Hydrolase and transglycosylase activities of beta-galactosidasein growing culture of *Cryptococcus* species 36

Lemkina L.M., Poludova T.V., Korobov V.P., Avdeeva N.S. Inhibitory effect of war-

Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Коробов В.П., Авдеева Н.С. Ингибирующее действие варнерина на клинические штаммы стафилококков с множественной устойчивостью к антибиотикам 37

Лепехина Е.В., Смирнова Г.В. Влияние температурных стрессов на действие ципрофлоксацина в культурах *Escherichia coli* 38

Магданова Л.А., Голясная Н.В. Метастабильный мутаторный фенотип в популяции *Pseudomonas aeruginosa* 38

Максимова А.В., Павлова Ю.А., Кузнецова М.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Характеристика генов, кодирующих альдоксимдегидратазы нитрилутилизирующих почвенных бактерий 39

Митько В.Е., Гарусов А.В., Ильинская О.Н., Маргулис А.Б. Производные фуранонов как ингибиторы плотностно-зависимых процессов у бактерий 41

Морозова А.Н., Головнева Н.А. Влияние различных методов дезинтеграции на β-галактозидазную активность бифидобактерий 42

Новоселова Н.Н., Ананьина Л.Н., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Таксономическая ревизия культур актинобактерий, поддерживаемых в региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов, на основе анализа последовательностей 16S рРНК-гена 43

Павлова Ю.А., Неустроева А.Н., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Исследование влияния температуры, pH и ингибиторов на активность энантиоселективной амидазы *Rhodococcus erythropolis* 44

Перебатова Е.А., Ремезовская Н.Б., Максимов А.Ю. Влияние условий внешней среды на эстеразную активность ферментного препарата, полученного из штаммов почвенных протеобактерий и актинобактерий 45

Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Ерошенко Д.В., Коробов В.П. Влияние факторов внешней среды на начальные этапы формирования биопленок *Staphylococcus epidermidis* 33 46

Романова М.А., Атыкян Н.А., Ревин В.В. Исследование биохимической активности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* рас «Ангел» и «XII» при культивировании в сусле повышенной плотности 48

Рубцова Е.В., Криворучко А.В., Ноговицына Е.М., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Адгезивные свойства TN5-мутантов родококков 49

Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Изучение влияния растительных полифенолов на чувствительность бактерий *Escherichia coli* к действию антибиотиков 50

Семенов А.В. Прикладные аспекты исследования бактериального антагонизма в условиях межмикробных отношений 51

Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. Почвы морских побережий как среда обитания *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* 52

Соболева Ю.В. Популяционно-коммуникативный подход в изучении микросимбиоценозов верхних дыхательных путей в норме и при патологии 53

Столбова М.Г., Несчисляев В.А. К вопросу использования сорбентов в производстве пробиотических препаратов 54

Стукова Г.И., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Антиадгезивная активность *Rhodococcus*-биосурфактанта в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий 55

Сыроегин Е.А., Петрова О.Е., Горшков В.Ю., Сузина Н.Е., Даминова А.Г., Гоголев Ю.В. Особенности стресса, вызванного голоданием, фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* штамм SCRI 1043 56

Сырых Э.В., Волкова А.В., Яковлева Г.Ю., Волошин А.В., Крушельницкий А.Г., Куриненко Б.М. Нарушение мембранных структур клеток *Escherichia coli* 2,4,6 тринитротолуолом 57

Трубицын И.В., Андреевских Ж.Г., Баркалова Е.В., Антипов А.Н. Биохимические и генетические аспекты диссимиляционной нитратредукции у представителей рода *Thiothrix* 58

Тухбатова Р.И., Панкова А.В., Мельников Л. В., Алимова Ф. К. Микробиота палеопочв Больше-Кляринского городища эпохи средневековья 59

Уманская М.В., Краснова Е.С. Характеристика бактериопланктона озера Кандры-Куль в летний период 2010 г. 60

Уткина Т.М., Карташова О.Л. Изучение связи в системе «структура-функция» на примере пентациклических тритерпеноидов 61

Ушаков В.Ю. Изменение Eh и уровня тиолов у бактерий *Escherichia coli* при действии ципрофлоксацина 62

Филатова Л.Б., Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Монахов В.И., Коробов В.П. Сравнительный анализ бактериолитических эффектов детергентов и катионного пептида варнерина 63

Хузяхметова В.Р., Шарипова И.Р., Яруллина Д.Р., Фахруллин Р.Ф., Ильинская О.Н. Модификация клеток пробиотических лактобацилл магнитными на-

nerin on clinical *Staphylococcus* strains with multiple resistance to antibiotics 37

Lepekhina E.V., Smirnova G.V. Influence of temperature stresses on the ciprofloxacin action in *Escherichia coli* 38

Magdanova L.A., Golyasnaya N.V. Metastable mutator phenotype in the population of *Pseudomonas aeruginosa* 38

Maksimova A.V., Pavlova Yu.A., Kuznetsova M.V., Maksimov A.Yu. Description of aldoxime dehydratase genes from nitrile-degrading bacteria 39

Mit'ko V.E., Garusov A.V., Ilinskaya O.N., Margulis A.B. Furanone derivatives as inhibitors of quorum-sensing in bacteria 41

Morozova A.N., Golovneva N.A. The effect of different disintegration methods on β-galactosidase activity of bifidobacteria 42

Novoselova N.N., Ananina L.N., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Taxonomic revision using 16S rRNA gene analysis of actinobacterial cultures maintained in the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms 43

Pavlova Yu.A., Neustroeva A.N., Maksimov A.Yu., Demakov V.A. Investigation of the effect of temperature, pH and inhibitors on the enantioselective amidase activity of *Rhodococcus erythropolis* 44

Perebatova E.A., Remezovskaya N.B., Maksimov A.Yu. Effect of the environment on esterase activity of the enzyme preparation obtained from strains of soil proteobacteria and actinobacteria 45

Poludova T.V., Lemkina L.M., Eroshenko D.V., Korobov V.P. Effect of environmental factors on initial stages of *Staphylococcus epidermidis* 33 biofilm formation 46

Romanova M.A., Atykyan N.A., Revin V.V. The biochemical activity of *Saccharomyces cerevisiae* during high density wort fermentation 48

Rubtsova E.V., Krivoruchko A.V., Nogovitsina E.M., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Adhesive properties of TN5 *Rhodococcus* mutants 49

Samoylova Z.Y., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Investigation of the influence of polyphenols on susceptibility of *Escherichia coli* bacteria to antibiotics 50

Semenov A.V. Applied aspects of investigations of bacterial antagonism in cross-species interaction between microorganisms 51

Sidorenko M.L., Byzoleva L.S. Soils of sea coasts as *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* habitat 52

Soboleva J.V. Population-communicative approach in studying the upper respiratory tract microsymbioconoses in health and pathology 53

Stolbova M.G., Neschislayew V.A. Revisited application of sorbents in probiotic preparation production 54

Stukova G.I., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Antiadhesive activity of *Rhodococcus* biosurfactant against gram negativa and gram positive bacteria 55

Syroegin E.A., Petrova O.E., Gorshkov V.J., Suzina N.E., Daminova A.G., Gogolev Yu.V. Characteristics of stress caused by starvation in phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strain SCRI 1043 56

Syryh E.V., Volkova A.V., Yakovleva G. Yu., Voloshin A.V., Krushelnitskij A.G., Kurinenko B.M. The infringement of *Escherichia coli* cell membrane structures by 2, 4, 6-trinitrotoluene 57

Trubitsin I.V., Andreevskih J.G., Barkalova E.V., Antipov A.N. Biochemical and genetic aspects of dissimilatory nitrate reduction in genus *Thiothrix* 58

Tukhbatova R.I., Pankova A.V., Melnikov L.V., Alimova F.K. Microbiota of paleosoils of the middle Volga region in the middle ages 59

Umanskaya M.V., Krasnova E.C. Characteristic of bacterioplankton of lake Kandry-Kul in summer 2010 60

Utkina T.M., Kartashova O.L. Communication studying in system "srtucture-function" on an example triterpenoid derivatives of the lupine line 61

Ushakov V.Yu. Shift of eh value and thiol levels in *Escherichia coli* bacteria exposed to ciprofloxacin action 62

Filatova L.B., Poludova T.V., Lemkina L.M., Monachov V.I., Korobov V.P. Comparative assay of bacteriolytic effects of detergent and cationic peptide warnerin 63

Khuzyakhmetova V.R., Sharipova I.R., Yarullina D.R., Fakhrullin R.F., Ilinskaya O.N Functional modification of probiotic lactobacilli cells using magnetic nanoparticles 64

Tsvetkova N.A., Guzachova I.M. Chained chi – sites and G4 DNA structures in the genomes *Escherichia coli* and *Pseudomonas* 65

Chernenkov A.Ju., Fedorov D.V., Kovaltsova S.V., Evstiukhina T.A., Gracheva L.M., Fedorova I.V., Peshekhonov V.T., Korolev V.G. Interactions of Hsm3 gene with the members of recombination and postreplicative dna repair epistatic groups and yeast *Saccharomyces cerevisiae* Hsm3 protein domain structure genetic analisys 66

Chechetkina U.E., Evteeva N.I., Rechkin A.I. Enterobacteria – representatives of

ночастицами 64

Цветкова Н.А., Гузачева И.М. Сцепление CHI – сайтов и G4 ДНК структур в геномах *Escherichia coli* и *Pseudomonas* 65

Черненков А.Ю., Фёдоров Д.В., Ковальцова С.В., Евстюхина Т.А., Грачёва Л.М., Фёдорова И.В., Пешехонов В.Т., Королёв В.Г. Взаимодействие гена Hsm3 с генами эпистатических групп рекомбинационной и пострепликативной репарации и генетический анализ доменной структуры белка Hsm3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 66

Чечёткина У.Е., Евтеева Н.И., Речкин А.И. Энтеробактерии – представители микрофлоры медоносных пчёл 67

Широкова О.А., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как фактор регуляции биопленкообразования *Escherichia coli* 68

Шумков М.С., Гончаренко А.В., Кылосова А.М., Ткаченко А.Г. Полиамины как фактор регуляции экспрессии гена LDCC *Escherichia coli* в условиях действия антибиотиков 69

Разнообразие микроорганизмов и его сохранение

Автух А.Н., Винокурова Н.Г., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Барышникова Л.М. Состав полярных липидов как хемотаксономический маркер видов рода *Kribbella* 71

Азнабаева Л.М. Биоразнообразие стрептококков слизистой оболочки миндалин человека 72

Бекшенева Л.Ф., Дорофеева Л.В., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Присяжная Н.В., Краузова В.И., Демкина Т.С., Тульская Е.М. Гетерогенность штаммов вида *Nocardioides albus* 73

Бокарева Д.А., Галанина Л.А., Сергеева Я.Э., Мысякина И.С., Усов А.И., Феофилова Е.П. Состав клеточных стенок мицелиальных грибов как критерий в систематике и филогении 74

Боргояков В.Ю., Васькова А.А. Выявление боррелий в клещах, собранных на территории Новосибирской области в 2009-2010 гг. 75

Гладких А.С., Белых О.И., Левина О.В., Парфенова В.В. Метагеномный анализ сообществ микроорганизмов из озера Байкал 76

Горбачева М.А., Полянская Л.М. Распределение бактерий по их размерам в аэробных и анаэробных условиях в черноземе в ходе микробной сукцессии 78

Капаруллина Е.Н., Порошина М.Н., Доронина Н.В., Ковалевская Н.П. Новые штаммы аэробных метилотрофных бактерий из биотопов Соликамска 79

Карташев А., Бурец Е., Коев Г., Богдан Н. Штаммы молочнокислых бактерий с перспективными для молочной промышленности биотехнологическими свойствами 80

Корсакова Е.С., Ананьина Л.Н., Назаров А.В., Плотникова Е.Г. Филогенетическое разнообразие бактерий ризосферы растений, произрастающих на техногеннозасоленных почвах 81

Кутлубердина Д.Р., Хайруллин Р.М. Новые пути снижения вредоносности фузариоза колоса 82

Николаева Т.Г., Сунгатуллина Л.М., Рябичко С.С. Структура сообществ почвенных микромицетов агроэкосистем в условиях ландшафтно-экологического земледелия на севере лесостепи Приволжской возвышенности 83

Парамонов А.Ю., Свистова И.Д. Видовое разнообразие микромицетов в почве под лекарственными растениями 85

Рыжманова Я.В., Вайнштейн М.Б., Щербакова В.А. Анаэробные бактерии содовых озер Южного Забайкалья 86

Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Арискина Е.В. Оценка видового разнообразия штаммов *Brevundimonas* методом ARDRA в сочетании с MALDI-TOF масс-спектрометрией 87

Шляпина Ю.Н., Степина А.С., КаменскихТ.Н., Ившина И.Б. Методы консервации коллекционных культур актинобактерий рода *Rhodococcus* 88

Шолохова К.Н., Плотников А.О. Жизненный цикл нового вида галофильных гетеротрофных гетеролобозных эукариотических микроорганизмов *Pharyngomonas* sp. 90

Взаимодействие микро- и макроорганизмов

Бухарин О.В. Симбиоз – биологическая основа инфекции 91

Балцат К.К., Постолакий О.М., Плешка Т.А., Бурцева С.А. Биологическая активность новых штаммов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы 92

Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Использование полисахаридов при обработке семян пшеницы биопрепаратом 93

honeybee microflora 67

Shirokova O.A., Nesterova L.U., Tkachenko A.G. Polyamines are an *Escherichia coli* biofilm formation regulatory factor 68

Shumkov M.S., Goncharenko A.V., Kylosova A.M., Tkachenko A.G. Polyamines as a factor of regulation of *Escherichia coli* ldcc gene expression under antibiotic treatment 69

Microbial Biodiversity and its Conservation

Avtukh A.N., Vinokurova N.G., Ariskina E.V., Dorofeeva L.V., Baryshnikova L.M. Polar lipid composition as a chemotaxonomic marker of species in the genus *Kribbella* 71

Aznabaeva L.M. Streptococcal biodiversity in human tonsil mucosal lining 72

Beksheneva L.F., Dorofeeva L.V., Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Prisyazhnaya N.V., Krauzova V.I., Demkina T.S., Tul'skaya E.M. Heterogeneity among strains of the species *Nocardioides albus* 73

Bokareva D.A., Galanina L.A., Sergeeva Ya.E., Mysyakina I.S., Usov A.I., Feofilova E.P. Cell wall composition of mycelial fungi as a systematic and phylogenetic criterion 74

Borgoyakov V.Ju., Vaskova A.A. Study of borrelia in ticks collected in Novosibirsk region within the period from 2009 to 2011 75

Gladkikh A.S., Belykh O.I., Levina O.V., Parfenova V.V. Metagenomic analysis of the bacterial communities from lake Baikal 76

Gorbacheva M.A., Polyanskaya L.M. Distribution of bacteria by their size in aerobic and anaerobic conditions in chernozem during microbial succession 78

Kaparullina E.N., Poroshina M.N., Doronina N.V., Kovalevskaya N.P. New strains of aerobic methylotrophic bacteria from Solikamsk biotopes 79

Kartashev A., Burets E., Koev G., Bogdan N. Lactic acid bacteria strains with perspective biotechnological properties for the dairy industry 80

Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Nazarov A.V., Plotnikova E.G. Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants growing on technogenically mineralized soils 81

Kutluberdina D.R., Khairullin R.M. Novel pathways for fusarium head blight injuriousness reduction 82

Nikolaeva T.G., Sungatullina L.M., Ryabichko S.S. The structure of soil micromycete communities in agroecosystems under landscape-ecological agriculture in northern forest-steppe of the Volga upland 83

Paramonov A.U., Svistova I.D. Diversity of micromycetes species in soil under medicinal plants 85

Ryzhmanova Y., Vainshtein M., Shcherbakova V. Anaerobic bacteria of soda lakes of the Southern Baikal 86

Starodumova I.P., Prisyazhnaya N.V., Ariskina E.V. Using ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry for the species diversity estimation of bacteria of the genus *Brevundimonas* 87

Shlyapina Yu.N., Stepina A.S., Kamenskikh T.N., Ivshina I.B.. Conservation techniques for *Rhodococcus* collection cultures 88

Sholohova K.N., Plotnikov A.O. Life cycle of a new species of halophilic eukaryotic heterotrophic geterolobosean microorganism *Pharyngomonas* sp. 90

Interaction between Micro- and Macroorganisms

Bukharin O.V. Symbiosis – biological basis of infection 91

Baltsat K.K., Postolakyi O.M., Pleshka T.A., Boortseva S.A. Biological activity of new streptomycete strains isolated from moldavian soil 92

Burova Ju.A., Ibragimova S.A., Revin V.V. Use of polysaccharides at processing of seeds of wheat by the biological product 93

Velichko N.S., Smol´kina O.N., Dykman L.A., Staroverov S.A., Ignatov V.V. Composition peculiarities and immunochemical characterization of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 memebrane lipopolysaccharide 94

Voitova E.E., Popov A.D. Nonspecific and colonization resistanse state of pregnant women with metabolic syndrome 95

Dolgikh Ja.V., Neschislayev V.A., Belova I.V. Comparative characterization of multicomponent probiotics 97

Zaikina E.A., Burkhanova G.F., Yarullina L.G. Signaling regulation of oxidoreductase gene expression in «plant – pathogenic fungi» systems 98

Величко Н.С., Смолькина О.Н., Староверов С.А., Дыкман Л.А., Игнатов В.В. Особенности состава и иммунохимическая характеристика мембранного липополисахарида бактерий *Herbaspirillum seropedicae* Z78 94

Войтова Е.Е., Попов А.Д. Состояние колонизационной и неспецифической резистентности у беременных с метаболическим синдромом 95

Долгих Я.В., Несчисляев В.А., Белова И.В. Сравнительная характеристика поликомпонентных пробиотиков 97

Зашкина Е.А., Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г. Сигнальная регуляция экспрессии генов оксидоредуктаз в системе «растение – грибной патоген» 98

Зотова М.А., Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф.,Орнер И.Ю., Батурина И.Л., Никушкина К.В. Факторы персистенции генитальной папилломавирусной инфекции 99

Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Новикова И.В., Ларина Т.П. Изменение концентрации про- и противовоспалительных цитокинов человека под действием супернатантов микроорганизмов 100

Калина Н.Д., Чернышова Л.Е., Куранов Г.В., Хохрякова В.П. Антимикробные свойства сероводородной минеральной воды курорта «Усть-Качка» 101

Каримов И.Ф., Качкова Д.Н. Биолюминесцентные технологии оценки молекулярных и клеточных бактерицидных факторов естественного иммунитета 102

Кирьянова И.Н., Баландина С.Ю., Крылова И.О., Четина О.А., Александрова Г.А. О проблеме плесневого загрязнения жилых помещений города Перми 103

Крылова Т.В., Несчисляев В.А., Чистохина Л.П. К вопросу определения антимикробной активности метаболитов пробиотических штаммов 104

Литвинов В.В., Лемкина Л.М., Фрейнд Г.Г., Коробов В.П. Экспериментальные подходы к созданию модели катетер-ассоциированной инфекции, обусловленной биопленками стафилококков 105

Лукаткин А.А., Ревин В.В. Определение эффективности ростостимулирующего действия биопрепарата на основе *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на растения огурца 106

Лукьянцев М.А., Хайруллин Р.М. Сравнительная характеристика некоторых антибиотиков эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* с различной степенью антагонизма к фитопатогенным грибам 107

Масленникова И.Л., Ширшев С.В., Некрасова И.В. Сравнительная характеристика рекомбинантных *Escherichia coli* lux+, используемых для оценки фагоцитоза 108

Минакова В.В., Карнаухова И.В. , Осинкина Т.В., Минакова В.В. Исследование лизоцима из различных тканей двустворчатых моллюсков *Anodonta cygnea* 109

Осьмуха У.Г., Латюшина Л.С., Синицкий А.И., Козочкин Д.А. Изменение соотношения между различными категориями продуктов перекисного окисления липидов и окислительно-модифицированными белками в слюне больных с апикальным периодонтитом 110

Первушина К.А., Маракаев О.А., Холмогоров С.В., Шеховцова Н.В., Осипов Г.А. Микробиологическая характеристика стеблекорневых тубероидов как органов с лекарственными свойствами 111

Ренева Л.В., Волкова Л.В., Черешнев В.А. Динамика поствакцинального иммунитета к клещевому энцефалиту у активных доноров плазмы 112

Свиридова Т.Г., Ибрагимова Р.М. Эффекты бактерильных ауторегуляторов (алкилоксибензолов и гомосеринлактонов) на фагоцитарные клетки периферической крови человека 113

Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Коннова С.А., Игнатов В.В. Особенности строения липидов А-типового и мутантных штаммов *Azospirillum brasilense* 114

Ситникова А.С., Старикова Н.Н., Быкова Л.П., Задорина И.И., Годовалов А.П. Влияние пломбировочного материала «Радент» на микроорганизмы при хроническом периодонтите 116

Сорокань А.В., Валеев А.Ш., Трошина Н.Б., Максимов И.В. Регуляция устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза *Phytophthora infestans* (mont) *de bary* салициловой и жасмоновой кислотами 117

Старикова Н.Н., Ситникова А.С., Быкова Л.П., Задорина И.И., Годовалов А.П., Косолапова Е.Ю Влияние пломбировочного материала «Радент» в сочетании с магнитолазерным излучением на некоторые свойства *Escherichia coli* 118

Шаравин Д.Ю., Ковалевская Н.П. Взаимодействие галотолерантных метилотрофных бактерий с растениями в условиях солевого стресса 119

Шкода О.С., Фоменко Н.В., Чикова Е.Д., Морозкин Е.С., Милейко В. А., Власов В.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю. Изменение концентрации цирДНК в процессе развития гуморального иммунного ответа при иксодовом клещевом боррелиозе 120

Шпирная И.А., Цветков В.О., Басырова А.М., Фостий З.А., Ибрагимов Р.И. Диффузия ингибиторов пектиназы *Aspergillus niger* из прорастающих семян злаков 121

Zotova M.A., Abramovskikh O.S., Telesheva L.F., Orner I.Y., Baturina I.L., Nikushkina K.V. Persistence factors of genital hpv infection 99

Ivanova E.V., Perunova N.B., Novikova I.V., Larina T.P. The change in the concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines rightsunder the influence of microorganisms supernatants 100

Kalina N.D., Chernyshova L.E., Kuranov G.V., Khokhryakova V.P. Antimicrobic properties of hydrosulphuric mineral water of health resort «Ust-Kachka» 101

Karimov I.F., Kachkova D.N. Bioluminescent technologies of detecting molecular and cellular bactericidal factors of innate immunity 102

Kiryanova I.N., Balandina S.Ju., Krylova I.O., Chetina O.A., Aleksandrova G.A. The problem of mould contamination in perm living quarters 103

Krylova T.V., Neschislayew V.A., Chistokhina L.P. Revisited determination of antimicrobial activity of probiotic strain metabolites 104

Litvinov V.V., Lemkina L.M., Fraind G.G., Korobov V.P. Experimental approaches to modeling a catheter-related infection caused by staphylococcus biofilms 105

Lukatkin A.A., Revin V.V. Efficiency of growth-stimulating action of biological preparation based on *Pseudomonas aureofaciens* 2006 on cucumber plants 106

Lukyantsev M.A., Khairullin R.M. Comparative characteristic of some antibiotics of endophytic *Bacillus subtilis* strains with different level of antagonism to plant pathogenic fungi 107

Maslennikova I.L., Shirshev S.V., Nekrasova I.V. Comparative characterization of recombinant *Escherichia coli* lux+ being used for the phagocytosis estimation 108

Minakova V.V., Karnauhova I.V., Osinkina T.B., Minakova V.V. Research of the lysozyme from various tissues of bivalvia molluscums *Anodonta cygnea* 109

Osmuha U.G., Latushina L.S., Sinitskii A.I., Kozochkin D.A. Changing balance between different categories of products lipid peroxidation and oxidation-modified proteins in the saliva with apical periodontitis 110

Pervushina K.A., Marakaev O.A., Kholmogorov S.V., Shehovtsova N.V., Osipov G.A. Microbiological characteristic of tubers as organs with medicinal properties 111

Reneva L.V., Volkova L.V., Chereshnev V.A. Assessment of the specific activity, duration and intensity of postvaccinal immunity to tick-borne encephalitis in active donors of plasma 112

Sviridova T.G., Ibragimova R.M. Effects of bacterial autoregulators (alkyloxybenzenes and homoserin lactones) on human peripheral blood phagocytic cells 113

Sigida E.N., Fedonenko Yu.P., Konnova S.A., Ignatov V.V. Peculiarities of the lipid a structure of *Azospirillum brasilense* type and mutant strains 114

Sitnikova A.S., Starikova N.N., Bykova L.P., Zadorina I.I., Godovalov A.P. The study of the influence of different ways of compounding filling material «Radent» on the viability of the microorganisms, selected with the periodontities 116

Sorokan A.V., Valeev A.Sh., Troshina N.B., Maksimov I.V. Regulation of potato resistance to the late blight pathogen *Phytophthora infestans* (mont) *de bary* by salicylic and jasmonic acids 117

Starikova N.N., Sitnikova A.S., Bykova L.P., Zadorina I.I., Godovalov A.P., Kosolapova E.Iu. The study of the influence of the filling material «Radent» and the combined intervention of laser light and magnetic field on some propertis of *Escherichia coli* 118

Sharavin D.Ju., Kovalevskaya N.P. Methylotrophic bacteria interaction with plants under salt stress 119

Shkoda O.S., Fomenko N.V., Chikova E.D., Morozkin E.S., Mileiko V.A., Vlassov V.V., Lactionov P.P., Rykova E.Y. Cirdna concentration changes in lyme borreliosis patient blood during the antibody response development 120

Shpirnaya I.A., Tsvetkov V.O., Basyrova A.M., Fostiy Z.A., Ibragimov R.I. Diffusion of inhibitors of *Aspergillus niger* pectinase from germinating seeds of cereals 121

Ecological Immunology. Regulation of Immunity

Babaev A.A., Starkova D.V., Patrina A.M., Kopylova G.E., Novikov V.V. Serum adhesion molecule level under autoimmune diseases 123

Bochkova M.S., Bachmetyev B.A., Shirshev S.V. Thyroxin effect on secondary humoral immune response, delayed-type hypersensitivity reaction and leukocyte phagocytic activity 124

Brodovsky M.B., Lebedinskaya O.V., Lebedinskaya E.A., Melekhin S.V., Godovalov A.P. Immunophenotypic and functional properties of murine mononuclear leukocytes under the influence of natrii nucleinas on induced immunosupression 125

Galayko N.V., Bayeva T.A., Ketova J.A., Volkova L.V., Gein S.V., Grishko V.V. Antiviral and immunotropic activities of A-secotriterpene acylhydrazone 126

Экологическая иммунология. Регуляция иммунитета

Бабаев А.А., Старкова Д.В., Патрина А.М., Копылова Г.Е., Новиков В.В. Сывороточное содержание молекул адгезии при аутоиммунных заболеваниях 123

Бочкова М.С., Бахметьев Б.А., Ширшев С.В. Влияние тироксина на вторичный гуморальный иммунный ответ, реакцию гиперчувствительности замедленного типа и фагоцитарную активность лейкоцитов 124

Бродовский М.Б., Лебединская О.В., Лебединская Е.А., Ахматова Н.К., Годовалов А.П. Иммунофенотипические и функциональные свойства мононуклеарных лейкоцитов мышей при действии нуклеината натрия на фоне индуцированной иммуносупрессии..... 125

Галайко Н.В., Баева Т.А., Кетова Ю.А., Волкова Л.В., Гейн С.В., Гришко В.В. Противовирусная и иммунотропная активность А-секотритерпенового ацетилгидразона 126

Глебездина Н.С., Куклина Е.М., Ширшев С.В. Анализ реактивности периферических αβТ-лимфоцитов беременных самок на антигены самца 127

Годовалов А.П., Шилов Ю.И. Влияние тироксина на пролиферативный ответ лимфоцитов в культурах с конканавалином А *in vitro* 128

Гугович А.М., Харахорина Р.А., Долгих О.В. Механизмы клеточной гибели в условиях различной химической нагрузки..... 129

Гужева Л.Б., Волков А.Г., Артюшкин М.В., Ерошенко Д.В., Коробов В.П. Биологические свойства комплекса низкомолекулярных пептидов, синтезируемых лейкоцитами человека в процессе интерфероногенеза 130

Заварин В.В., Радьков О.В., Ильинская Т.А., Синявская О.И. Ассоциация полиморфизма -1082G/A гена *IL10* с показателями реактивности микрососудов кожи у беременных с преэклампсией..... 132

Заморина С.А. Совместные эффекты хорионического гонадотропина и рекомбинантного ИЛ-2 на апоптоз лимфоцитов..... 133

Зуева Е.Б., Тиунова Т.А. Изучение параметров иммунной системы и уровней онкомаркеров у женщин с различными синдромами иммунопатологии 134

Зурочка В. А., Добрынина М. А., Костоломова Е.Г. Изучение свойств пептидов активного центра ГМ-КСФ и вещевств, полученных из супернатантов CD34+45- клеток предшественников гемопоэза 135

Кабановская И.Н., Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Годовалов А.П. Характеристика лейкоцитарных инфильтратов печени при иммуносупрессии, вызванной вирусным гепатитом..... 136

Корнеева О.С., Черемушкина И.В., Глущенко А.С. Исследование пребиотических и иммуномодулирующих свойств маннозы и манноолигосахаридов 137

Ланин Д.В., Харахорина Р.А., Лютова Л.В., Долгих О.В., Землянова М.А., Кирьянов Д.А. Гигиеническая оценка особенностей иммунной и эндокринной систем у женщин репродуктивного возраста, занятых на производстве активированных углей..... 138

Мазунина Л.С., Гаврилова Т.В., Гейн С.В., Черешнева М.В., Черешнев В.А. Влияние миелопептидов на бактерицидную активность клеток периферической крови .. 140

Маркова В.А., Савочкина А.Ю., Пегушина И.В., Шишкова Ю.С. Формирование внеклеточных ловушек активированными и неактивированными нейтрофилами слюны у здоровых женщин в I и II фазу менструального цикла..... 141

Некрасова И.В. Влияние эстриола на функциональую активность клеток врожденного иммунитета при рассеянном склерозе 142

Никитин О.В., Степанова Н.Ю., Латыпова В.З. Использование ИФА для скрининга цианотоксинов в поверхностных водоемах..... 143

Орлова Е.Г. Влияние лептина и грелина на синтез интерферона-γ и интерлейкина-4 Т-лимфоцитами периферической крови в системе *in vitro*..... 144

Плеханова Е.В., Цейликман В.Э., Синицкий А.И., Козочкин Д.А., Попов С.В. Изменение функционального статуса нейтрофилов и количества нейтрофильных внеклеточных ловушек у крыс при стрессе и его сочетаинии с экспериментальным перитонитом..... 145

Раев М.Б., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Тюленев А.В. Конструирование систем оценки уровня альфа-фетопротеина на основе углеродных частиц в сыворотке беременных женщин 146

Сайдакова Е.В., Шмагель К.В. Функциональная активность тимуса женщин во время беременности..... 148

Светлакова В.А., Давыдова Е.В. Маркеры повреждения нервной ткани при ранних формах хронической цереброваскулярной недостаточности..... 149

Семенов М.В. Состояние иммунной системы и регуляторных Т-клеток у пациентов с полипозным риносинуситом до и после лечения назальными кортикостероидами и фуросемидом 150

Семёнова И.В., Гизингер О.А., Зиганшин О.З., Зиганшина Т.А., Семёнов Ю.А. Иммунологическая эффективность локального применения ультразвука низкой интенсивности в комплексной терапии хронического вульвовагинального кандидоза 151

Glebezdina N.S., Kuklina E.M., Shirshev S.V. The analysis of reactance peripheral αβT-lymphocytes pregnant females on antigenes of the male..... 127

Godovalov A.P., Shilov Ju.I. Effect of thyroxine on the proliferative response of lymphocytes in cultures with concanavalin a *in vitro* 128

Gugovich A.M., Kharakhorina R.A., Dolgikh O.V. Cellular death mechanisms under the influence of various chemical loads 129

Guzheva L.B., Volkov A.G., Artyushkin M.V., Eroshenko D.V., Korobov V.P. The biological properties of the low-molecular peptide complex synthesized by the human leukocytes during interferonogenesis..... 130

Zavarin V.V., Radkov O.V., Il'inskaya T.A., Sinyavskaya O.I. Association of IL10 -1082G/A gene polymorphism with reactivity indices of skin microvessels in pregnant women with preeclampsia 132

Zamorina S.A. Combined effects of human chorionic gonadotropin and recombinant interleukin-2 on T-lymphocyte apoptosis..... 133

Zueva E.B., Tiunova T.A. Stadying of parametres of immune system and levels the oncological markers at women with various syndromes of immunopathologies..... 134

Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Kostolomova E.G. Stadying of new properties of synthetic peptides isolated from GM-CSF active center and the substances received from supernatantes of CD 34+45- cells predecessors of hemopoesis 135

Kabanovskaya I.N., Lebedinskaya O.V., Akhmatova N.K., Godovalov A.P. Characteristics of liver leukocytic infiltrates in immunosupression induced by viral hepatitis..... 136

Korneeva O.S., Cheremushkina I.V., Gluschenko A.S. The research of the prebiotic and immunomodulatory properties of mannose and mannooligosaccharides 137

Lanin D.V., Kharakhorina R.A., Lutova L.V., Dolgikh O.V., Zemlyanova M.A., Kiryanov D.A. Hygienic estimation of features of immune and endocrine systems of reproductive-age women working in activated carbons production..... 138

Mazunina L.S., Gavrilova T.V., Gein S.V., Chereshneva M.V., Chereshnev V.A. Effect of myelopeptides on reactive oxygen species' generation by peripheral blood cells..... 140

Markova V.A., Dolgushin I.I., Savochkina A.J., Pegushina I.V., Shishkova Y.S. Extracellular traps formation by activated and nonactivated salivary neutrophils in healthy women at i and ii phase of the menstrual cycle..... 141

Nekrasova I.V. The influence of estriol on the innate immunity cell activity at multiple sclerosis..... 142

Nikitin O.V., Stepanova N.Yu., Latypova V.Z. Elisa screening assay for cyanotoxins in water bodies..... 143

Orlova E.G. Leptin and ghrelin influence on inf-γ and il-4 synthesis in t-lymphocytes of peripheral blood *in vitro*..... 144

Plekhanova E.V., Tseilikman V.E., Sinitsky A.I., Kozochkin D.A., Popov S.V. Change in the functional neutrophil status and neutrophil extracellular traps number in rats under stress and its combination with experimental peritonitis 145

Rayev M.B., Bochkova M.S., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Tyulenev A.V. Designing of carbon particle-based systems for alpha-fetoprotein evaluation in sera of pregnant women 146

Saydakova E.V., Shmagel K.V. Thymic functional activity during pregnancy 148

Svetlakova V.A., Davidova E.V. Markers of nerve tissue injury in the early forms of chronic cerebrovascular diseases 149

Semenov M.V. Condition of immune system and regulatory T-cells at patients with polyposis rinisinusites before treatment nasals corticosteroids and furosemides 150

Semenova I.V., Gizinger O.A., Ziganshina T.A., Ziganshin O.R., Semenov Y.A. Immunological efficiency of low – frequency ultrasonic radiation at therapy chronic urogenital candidal infectio 151

Smirnova T.G., Savochkina A.Y., Dolgushin I.I., Shishkova Yu.S. Formation extracellular traps by neutrophils isolation from peripheral blood influenced by estriol..... 152

Usova V.V., Shilov Ju.I., Gavrilova T.V., Chereshneva M.V. Changes of interleukin-1beta production in blood cell cultures with lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium* in penetrating eye injury depending on inclusion in therapy myelopidum 153

Kharakhorina R.A., Dolgikh O.V., Lykhina T.S. Markers of allergic reactions in children under chemical load..... 154

Khonina N.A., Seledtsova N.V., Tichonova M.F., Chernykh E.R. Immune dysfunctions in pregnant women with suprarenal hyperandrogenia..... 155

Chromtsova G.A., Loginova N.P., Chetvertnyck V.A., Shchegoleva T.A. Thymus in newborn congenital heart disease 157

Смирнова Т.Г., Савочкина А.Ю., Долгушин И.И., Шишкова Ю.С. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилами, выделенными из периферической крови, под влиянием эстриола 152

Усова В.В., Шилов Ю.И., Гаврилова Т.В., Черешнева М.В. Изменение продукции интерлейкина-1бета в культурах клеток крови с липополисахаридом *Salmonella typhimurium* при проникающем ранении глаза в зависимости от включения в терапию миелопида..... 153

Харахорина Р.А., Долгих О.В., Лыхина Т.С. Маркеры аллергических реакций у детей в условиях различной гаптенной нагрузки 154

Хонина Н.А., Селедцова Н.В., Тихонова М.А., Черных Е.Р. Особенности иммунитета у беременных с надпочечниковой гиперандрогенией 155

Хромцова Г.А., Логинова Н.П., Четвертных В.А., Щеголева Т.А. Тимус новорожденных при врожденных пороках сердца 157

Шаравьёва И.Л., Гейн С.В., Тендрякова С.П. Влияние блокады опиатных рецепторов на функциональную активность спленоцитов в условиях стресса 158

Шилов Д.Ю. Взаимодействие адреналина и гидрокортизона в регуляции пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах с конканавалином А *in vitro* 159

Шилов С.Ю. Влияние орхидэктомии на стрессорные изменения количественного состава лейкоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови самцов крыс 160

Ширшев С.В., Орлова Е.Г. Регуляция лептином и грелином активности индоламин-2,3-диоксигеназы моноцитов 161

Микробная индикация загрязнений. Биология ремедиации окружающей среды

Амирова А.Р., Григориади А.С., Киреева Н.А Оценка эффективности использования органического удобрения для рекультивации почвы, загрязненной нефтешламом, по микробиологическим показателям 162

Антипина А.И., Кормильцева И.П., Яковлева Г.Ю., Захарова Н.Г., Куриненко Б.М. Оценка токсического действия 2,4,6-тринитротолуола на микромицеты родов Fusarium и Penicillium 163

Ахметзянова Л.Г., Селивановская С.Ю. Биологическая активность нефтезагрязненной почвы при различных способах рекультивации..... 164

Власов А.С., Белоногова В.Д., Курицын А.В. Оценка экологической чистоты и химическая таксация зарослей дикорастущих лекарственных растений Пермского края 165

Волченко Н.Н., Алёшина Н.Ю., Павлов В.В. Микробиологическая активность почвы, загрязнённой нефтью, при интродукции родококками-деструкторами углеводородов 166

Горностаева Е.А., Фокина А.И., Кондакова Л.В., Злобин С.С.2, Березин Г.И. Содержание тяжёлых металлов и групповой состав фототрофов в природных биоплёнках *Nostoc commune* как отклик на особенности местообитания 167

Григориади А.С., Амирова А.Р., Багаутдинова Л.Ф., Киреева Н.А. Использование *Tagetes erecta* для фиторемелиорации территорий, загрязненных выбросами предприятий нефтяной промышленности..... 168

Гумерова Р.Х., Низамутдинова А.З., Селивановская С.Ю. Моделирование ремедиации отходов нефтедобывающего комплекса, содержащего радиоактивные элементы, методом ландфарминга 169

Данг Т.Т., Логинова О.О., Белоусова Е.В., Шевченко М.Ю., Грабович М.Ю. Консорциум штаммов бактерий-нефтедеструкторов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв 170

Егорова А.С. Адаптация вида *Pecilomyces lilacinus* (thom) *samson* к радиоактивному загрязнению среды обитания..... 171

Егорова Д.О., Плотникова Е.Г. Разложение смеси хлорированных бифенилов с преобладанием тетразамещенных конгенеров штаммом *Microbacterium* sp. B51..... 172

Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Актуганов Г.Э., Маркушева Т.В. Характеристика консорциума бактерий-деструкторов 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты 173

Корчагина И.В., Свистова И.Д. Микробиоиндикация урбаноземов города Воронежа..... 175

Коршунова И.О., Егорова Д.О., Плотникова Е.Г. Влияние уровня соленности среды на рост штамма-деструктора *Rhodococcus* sp. Kt112-7b 176

Макарова Н.В., Марфенина О.Е., Иванова А.Е. Микроскопические грибы в воздушной среде мегаполиса (г. Москва)..... 177

Мухутдинова А.Н., Рычкова М.И., Вихарева Е.В.З, Ившина И.Б. Респираторная активность клеток *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 767 при биодеструкции ацетаминофена 178

Новикова Л.В., Степанова Н.Ю., Фаттахов С.Г. Деструкция нефти и её оста-

Sharavieva I.L., Gein S.V., Tendrjakova S.P. Influnce of opiate receptors blocade on functional activity of splenosytes under stress 158

Shilov D.Ju. Interaction of adrenalin and hydrocortisone in regulation of lymphocyte proliferative response in cultures with concanavalin A *in vitro* 159

Shilov S.Ju. Influence of orchidectomy on stress-induced changes of leukocyte count and neutrophil phagocytic activity of peripheral blood of male rats 160

Shirshev S.V., Orlova E.G. Leptin and ghrelin regulation of indoleamine 2,3 dioxygenase activity in monocytes 161

Microbial Indication of Pollutions. Biology of Environmental Bioremediation

Amirova A.R., Grigoriadi A.S., Kireeva N.A. Estimation of efficiency of use of organic fertilizer of soils polluted by oil sludge on microbiological indicators 162

Antipina A.I., Kormiltseva I.P., Yakovleva G.Yu., Zakharova N.G., Kurinenko B.M. Estimation of 2,4,6-trinitrotoluene toxic action on micromycetes of the genera *Fusarium* and *Penicillium*..... 163

Akhmetzyanova L.G., Selivanovskaya S.Y. Biological activity of oil polluted soil recultivated using different methods 164

Vlasov A.S., Belonogova V.D., Kuritsyn A.V. Estimation of ecological safety and chemical taxation of thickets of wild-growing medicinal plants of Perm region ... 165

Volchenko N.N., Aleshina N.Y., Pavlov V.V. Microbiological activity of oil-contaminated soil with introduced rhodococci–hydrocarbon destructors..... 166

Gornostaeva E.A., Fokina A.I., Kondakova L.V., Zlobin S.S., Berezin G.I. Heavy metal contents and phototroph type composition in natural *Nostoc commune* biofilms as a response to a particular habitat 167

Grigoriadi A.S., Amirova A.R., Bagautdinova L.F., Kireeva N.A. Use of *Tagetes erecta* for phyomelioration of soils polluted with emissions of petroleum industry 168

Gumerova R. Kh., Nizamutsinova A.Z., Selivanovskaya S.Yu. Modeling of remediation of the oily waste containing natural radioactive elements using landfarming method..... 169

Dang T.T., Loginova O.O., Belousova E.V., Shevchenko M.Yu., Grabovich M.Yu. The consortium of strains of bacteria-oil destructors of the genius *Acinetobacter* for bioremediation of contaminated soil..... 170

Egorova A.S. Adaptation of *Paecilomyces lilacinus* (thom) *samson* to radioactively-polluted habitat 171

Egorova D.O., Plotnikova E.G. Degradation of mixtures of chlorinated biphenyls with a predominance of tetrasubstituted congeners by strain *Microbacterium* sp. B51 172

Zharikova N.V., Zhurenko E.Y., Korobov V.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Aktuganov G.E., Markusheva T.V. Characterization consortium of bacteria- destructors of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid 173

Korchagina I.V., Svistova I.D. Microbioindication of urban soil of Voronezh city..... 175

Korshunova I.O., Egorova D.O., Plotnikova E.G. The effect of salinity on the growth of the strain-degrader *Rhodococcus* sp. Kt112-7b 176

Makarova N.V., Marfenina O.E., Ivanova A.E. Microscopic fungi in the air of the big city (Moscow) 177

Mukhutdinova A.N., Richkova M.I., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. Respiration activity of *Rhodococcus erythropolis* IEGM 767 in acetaminophen biodegradation 178

Novikova L.V., Stepanova N.Yu., Fattakhov S.G. Destruction and toxicity of oil in sediments under the influence of biologicaly aktive substance..... 180

Serebrennikova M.K., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Shasherina A.N., Osipenko M.A. Mathematical model of *Rhodococcus* cells immobilization process in a column bioreactor..... 181

Fedorova A.A., Korobov V.V., Zhurenko E.Y., Zharikova N.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Markusheva T.V. Characterization of the process of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid assimilation *Bacillus subtilis* 16 182

Shafigullin B.U., Galitskaya P.Yu., Mamaeva E.V. Use of microorganisms as indicators of soil defradation..... 184

Shestakova E.A., Nazarov A.V., Anan'ina L.N., Boronikova S.V. Effect of clover and fescue on remediation of hydrocarbon-contaminated soil 185

Biotransformation of Organic Molecules. Technologies for Microbial Product Synthesis

Anokhin B.A., Maksimov A.Yu., Demakov V.A. Investigation of dynamics and optimization of o-phthalate degradation by phthalate ester-transforming bacteria 187

точная токсичность в донных отложениях под влиянием биологически активного вещества 180

Серебренникова М.К., Куюкина М.С., Ившина И.Б., Шашерина А.Н., Осипенко М.А Математическое моделирование процесса иммобилизации родококков в колоночном биореакторе 181

Федорова А.А., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В. Особенности процесса ассимиляции 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты *Bacillus subtilis* 16 182

Шафигуллин Б.У., Галицкая П.Ю., Мамаева Е.В. Использование микроорганизмов в качестве индикаторов деградации почв 184

Шестакова Е.А., Назаров А.В., Ананьина Л.Н., Бороникова С.В. Влияние клевера и овсяницы на очистку почвы, загрязненной углеводородами 185

Биотрансформация органических молекул. Технологии синтеза микробных продуктов

Анохин Б.А., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Изучение динамики и оптимизация условий деградации о-фталата бактериями, трансформирующими фталевые эфиры 187

Бикташева Л.Р., Зверева П.А., Галицкая П.Ю. Анаэробное термофильное сбраживание смесей органических отходов 188

Боровкова И.С., Казаков Д.А., Вольхин В.В. Биокаталитическое окисление фенола в присутствии активаторов массопереноса O_2 из газовой фазы в водную 189

Бузмакова Д.Ю., Казьянин А.В., Волкова Л. В. Применение протеолиза для биотрансформации белков 190

Васильев Д.М., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Динамика трансформации 3-цианопиридина иммобилизованными и свободными клетками *Rhodococcus ruber* GT1 191

Darbinyan K.A. Continuous Biotransformation of Ethylene Glycol to Glyoxal by Application of Fungal Enzymes 192

Долгих Н.П., Фролкова К.С., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Биотрансформация ибупрофенамида штаммом *Rhodococcus rhodochrous* 193

Драгунова Ю.Е., Атыкян Н.А., Ревин В.В. Совмещение процессов гидролиза и брожения наноструктурированного зернового сырья 194

Елькин А.А., Кылосова Т.И., Гришко В.В., Ившина И.Б. Получение оптически активных сульфоксидов с использованием биокатализатора на основе иммобилизованных клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66 195

Захаркин Д.О., Атыкян Н.А., Ревин В.В. Исследование влияния степени дисперсности помола пшеничного зерна на накопление сахаров в сусле 196

Лебедева Е.С., Ивашина Т.В., Донова М.В. Идентификация генов, катализирующих первую стадию окисления стеринов у штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ АС-1815Д 197

Мараков Е.А., Кононова Л.И., Коробов В.П. Получение устойчивого к ванкомицину штамма *Staphylococcus epidermidis* 33 и его характерные особенности 198

Николаевич В.А. Ферментативный синтез N–ацилсфингозинфосфоэтанола и свойства липосом на его основе 199

Оленева М.А., Максимова Ю.Г. Гетерофазное культивирование *Rhodococcus ruber* GT1 как способ получения иммобилизованного биокатализатора гидролиза нитрилов 200

Разумова Ю.В., Чересиз С.В., Кочетов А.В., Беклемишев А.Б. Получение белка GAG ВИЧ-1, слитого с желтым флуоресцентным белком, в культуре *Leishmania tarentolae* 202

Сырвачева Д.А., Жила Н.О. Синтез среднецепочечных полигидроксиалканоатов 203

Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. Биокаталитическое получение 3-оксобетулина – ключевого интермедиата в синтезе фармакологически активных соединений 203

Четина О.А., Крылова И.О., Кирьянова И.Н. Нитрилгидратазная активность почвенных микромицетов в процессе биотрансформации производных карбоновых кислот 205

Шагабиева Ю.З., Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К. Биотрансформация углеводородов в нефтезагрязненной почве 206

Biktasheva L.R., Zvereva P.A., Galitskaya P.Yu. Anaerobic termophylic digestion of organic wastes mixtures 188

Borovkova I.S., Kazakov D.A., Vol'khin V.V. Phenol biocatalytic oxidation in the presence of oxygen mass transfer activators from the gas to liquid 189

Buzmakova D.Y., Kazjanin A.V., Volkova L.V. Production of protein hydrolysates of known qualitative composition 190

Vasiliev D.M., Maksimova Yu.G., Demakov V.A. The dynamics of 3-cyanopyridine transformation by immobilized and free *Rhodococcus ruber* GT1 cells 191

Darbinyan K.A. Continuous Biotransformation of Ethylene Glycol to Glyoxal by Application of Fungal Enzymes 192

Dolgikh N.P., Frolkova K.S., Maksimov A.Yu. Biotransformation of ibuprofen amide by *Rhodococcus rhodochrous* 193

Dragunova Ju.E., Atykyan N.A., Revin V.V. Combined processes of hydrolysis and fermentation of nanostructured grain raw material 194

Elkin A.A., Kylosova T.I., Grishko V.V., Ivshina I.B. Production of optically active sulfoxides using a biocatalyst based on immobilized *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 cells 195

Zaharkin D.O., Atykjan N.A., Revin V.V. The influence of dispersity of wheat grain grinding on carbohydrate accumulation in mash 196

Lebedeva E.S., Ivashina T.V., Donova M.V. Identification of genes katalizing initial step in sterol oxidation by *Mycobacterium* sp. AC-1815d 197

Marakov E.A., Kononova L.I., Korobov V.P. Production of vancomycin-resistant strain *Staphylococcus epidermidis* 33 and its specific properties 198

Nikolaevich V.A. Fermentative synthesis of n-acylsphingosinephosphoethanol and properties of liposomes based on it 199

Oleneva M.A., Maksimova Yu.G. Heterophase cultivation of *Rhodococcus ruber* GT1 as a method for obtaining immobilized biocatalyst of nitrile hydrolysis 200

Razumova Ju.V., Cheresiz S.V., Kochetov A.V., Beklemishev A.B. Production of recombinant HIV-1 GAG polyprotein fused to yellow Fluorescent Protein (EYFP) in *Leishmania tarentolae* 202

Syrvacheva D.A., Zhila N.O. Synthesis of medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate 203

Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biocatalytic production of 3-oxobetulin, a key intermediate in the synthesis of pharmacologically active compounds 203

Chetina O.A., Krylova I.O., Kiryanova I.N. Nitrile hidrataze activity of soil micromycetes in the biotransformation process of carboxylic acid derivatives 205

Shagabieva Yu.Z., Svarovskaya L.I., Filatov D.A., Altunina L.K. Biotransformation of hydrocarbons in oil-contaminated soil 206

Адрес редакции: 620014, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 12а, оф. 917. Тел./факс (343) 310-03-06. Эл. почта: vestnik-ural@mail.ru; www.vestnikural.ru
Издатель: Автономная некоммерческая организация «Редакция журнала “Вестник уральской медицинской академической науки”»
Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15434 от 19 мая 2003 г.
Сдано в набор 11.10.11 Подписано в печать 28.10.11 Формат 60x84 1/8. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10,3. Уч.-изд. л. 11. Тираж 150 экз.
Типография «Артикул», г. Екатеринбург, ул. Декабристов, 20, тел. (343) 251 61 75
Все права защищены. Перепечатка материалов и использование их в любой форме, в том числе и в электронных СМИ, возможны только с разрешения редакции.

УДК 579.22

Гончаренко А.В.

СИСТЕМЫ ТОКСИН-АНТИТОКСИН У БАКТЕРИЙ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, avg65@inbox.ru

Резюме. Токсин-антитоксин (ТА) генетические элементы широко распространены в бактериальных геномах. Они состоят из генов, кодирующих токсин и антитоксин. Свободный долгоживущий токсин может нанести вред бактериальной клетке, лабильный антитоксин его инактивирует. Уровень антитоксина регулируется внутриклеточными протеиназами Lon и ClpP. Когда уровень протеиназ возрастает, токсин освобождается и блокирует определенные клеточные функции, такие как трансляция и репликация. Роль ТА модулей в бактериальной физиологии является спорным вопросом, однако существуют доказательства, что ТА могут участвовать в стрессовом ответе бактерий как регуляторы бактериального роста. Наибольшее семейство ТА представлено vapBC оперонами. Токсин этого семейства принадлежит к Pin-доменовому семейству рибонуклеаз. Хромосома Mycobacterium tuberculosis (MTB) содержит 47 ТА модулей семейства vapBC. Роль этих модулей в физиологии MTB непонятна, но предполагается, что они задействованы в формировании латентного туберкулеза.

Ключевые слова: токсин-антитоксин модули, метаболизм, покоящиеся бактерии.

ТА гены были открыты как гены плазмид, обеспечивающие их поддержание в бактерии путем остановки роста клеток, утративших плазмиду [1]. Секвенирование большого количества бактериальных геномов позволило обнаружить, что ТА системы широко распространены в хромосомах большинства бактерий, как правило, они множественны и одна бактерия может содержать несколько ТА систем разных семейств [2]. Все ТА системы функционируют по одному принципу: стабильный токсин ингибирует важнейшие клеточные функции, лабильный антитоксин связывает токсин и тем самым инактивирует его. Токсин и антитоксин кодируются в одном опероне, первым геном, как правило, является антитоксин. ТА белковый комплекс связывается с промоторной областью ТА оперона, тем самым поддерживается низкий уровень транскрипции и трансляции [3]. Лабильный антитоксин чувствителен к внутриклеточным протеазам, таким как Lon и Clp, и при повышении их уровня в клетке появляется свободный токсин [2, 4].

Очевидно, что хромосомные ТА системы выполняют иную, отличную от плазмидных ТА функцию. Одна из гипотез рассматривает ТА локусы как инструменты программируемой клеточной смерти, останавливающие в стрессовых условиях рост и индуцирующие гибель большей части бактериальной популяции, что позволяет оставшимся клеткам выжить за счет сохранившихся пищевых ресурсов и вторичного роста [5, 6]. После того, как было продемонстрировано бактериостатическое, а не бактерицидное действие токсина (остановка роста бактериальной культуры при гиперэкспрессии токсина и восстановление роста при ко-экспрессии антитоксина) [7], было высказано предположение, что ТА системы нужны бактерии для перехода в нерепликативное состояние с низким уровнем метаболической активности (в покоящееся состояние), позволяющее пережить неблагоприятные условия [8].

Одним из социально значимых патогенов, проблема борьбы с которым связана с его способностью переходить в покоящееся состояние, является *M. tuberculosis*. ТА системы MTB чрезвычайно множественны и представлены несколькими семействами, преобладающим является vapBC семейство (47 ТА пар) [9]. Токсин VapC семейства vapBC является РНКазой и блокирует трансляцию, гидролизуя мРНК [10]. Роль этих ТА модулей в физиологии MTB непонятна, но предполагается, что они задействованы в формировании латентного туберкулеза.

Независимо от того, какую роль играют ТА модули в жизни бактерий, их изучение позволит лучше понять физиологию бактериальной клетки и, возможно, создаст основу для разработки лекарственных препаратов нового поколения.

Работа выполнена при поддержке ГК №14.740.11.08.01, 14.740.11.0246, 14.740.11.1056 и РФФИ 11-04-00713-а и №11-04-01440-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Teru O., Sota H.* Mini F – plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – V. 80. N. 15. – P. 4784-4788.

2. *Pandey D.P., Gerdes K.* Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes // Nucleic. Acids. Res. – 2005. – V. 33. N. 3. – P. 966-976.

3. *Christensen S.K.* et al. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. - V. 98. N. 25. – P. 14328-14333.

4. *Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G.* An *Escherichia coli* chromosomal «addiction module» regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93. N. 12. – P. 6059 6063.

5. *Engelberg-Kulka H.* et al. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria // PLoS Genet. – 2006. – V. 2. N. 10. – E: 135.

6. *Engelberg-Kulka H.*, Yelin I., Kolodkin-Gal I. Activation of a built-in bacterial programmed cell death system as a novel mechanism of action of some antibiotics // Commun Integr Biol. – 2009. – V. 2. N. 3. – P. 211-212.

7. *Pedersen K.* et al. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site // Cell. – 2003. – V. 112. N. 1. – P. 131-140.

8. *Magnuson R.D.* Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems // J Bacteriol. – 2007. – V. 189. N. 17. – P. 6089-6092.

9. *Ahidjo B.A.* et al. VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins // PLoS One – 2011. – V. 6. N. 6. – E: 21738.

10. *Anantnaraman V., Aravind L.* New connections in the prokaryotic toxin – antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense – mediated RNA decay system // Genome Biol. – 2003. – V. 4. N. 12. – P. 81.

Goncharenko A.V.

TOXIN – ANTITOXIN SYSTEMS OF BACTERIA

A.N. Bach Institute of Biochemistry,

Moscow, Russia, avg65@inbox.ru

Summary. Toxin-antitoxin (TA) systems are genetic modules that are widespread in the bacterial genomes. They are composed of genes encoding a stable toxin that can damage the bacterial cells and small labile antitoxin that inactivates a longer lived toxin. Antitoxins are proteolytically regulated by protease Lon and ClpP. When protease levels increase the toxin is free to inhibit the definite cellular function, such as translation or replication. The role of the TA modules in bacterial physiology is the subject of debates, however there is evidence that TA may act in the stress physiology by serving as regulators of growth. The largest family of bacterial TA is formed by vapBC operons. Their toxin components belong to the Pin-domain family ribonucleases. The chromosome of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) contains forty seven TA modules of VapBC family. The role of these modules in the physiology Mtb is poorly understood, however there is opinion the TA take a part in the latent Mtb formation.

Key words: toxin-antitoxin modules, metabolism, dormant cells.

УДК 579.22

Коробов В.П.

ЛАНТИБИОТИКИ – ПРИРОДНЫЕ АНТИБИОТИКИ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, korobov@iegm.ru

Резюме. Одной из главных проблем лечения бактериальных заболеваний является быстрое появление и распространение устойчивости микробных агентов к вводимым в практику антибиотическим соединениям. В связи с этим привлекают внимание эффективные антибактериальные системы, которые функционируют практически на всех ступенях эволюционной лестницы – от бактерий до человека. Главным орудием этих систем являются различные пептидные соединения, в частности, низкомолекулярные катионные пептиды семейства лантибиотиков. В работе представлены особенности структуры и механизмов антибактериального действия лантионин-содержащих пептидов и перспективы их практического использования.

Ключевые слова: низкомолекулярные пептиды, лантибиотики, антибактериальное действие.

История изучения ответных реакций бактерий на антибиотические соединения свидетельствует о быстром формировании ими защитных механизмов, обеспечивающих сохранение жизнеспособности и даже рост клеток при относительно высоких концентрациях антибиотиков. Эта пластичность бактериальных популяций при широком и практически нерегламентированном применении антибиотиков способствует постоянному отбору антибиотикоустойчивых штаммов как сапрофитных, так и патогенных бактерий.

Благодаря стремительному географическому дрейфу антибиотикоустойчивости и интенсивному обмену мобильными генными конструкциями [1, 2], вся биота Земли, по данным Союза по разумному использованию антибиотиков (http://www.apua.org), оказалась под прессом новой глобальной проблемы – роста и тотального распространения в окружающей среде антибиотикорезистентных бактерий. Полученные в клинических исследованиях данные свидетельствуют о появлении бактерий, устойчивых одновременно к 8-10 используемым практической медициной антибиотикам [3-5]. Высокие темпы появления устойчивых к антибиотикам бактерий требуют детального изучения фундаментальных механизмов развития антибиотикорезистентности и экстренного внедрения эффективных способов предупреждения и сдерживания ее экспансии. Это достигается, главным образом, за счет новых поколений синтетических и полусинтетических антибиотиков. Однако, наличие в бактериях систем ферментативного обезвреживания и выброса из клеток чужеродных веществ быстро обесценивает финансовые затраты на разработку, производство и внедрение в практику новых антибактериальных препаратов.

Таким образом, предупреждение формирования антибиотикорезистентности и разработка способов подавления развития антибиотикоустойчивых бактерий являются фундаментальными проблемами биологии и медицины, успешное решение которых во многом определит устойчивость биологических систем на нашей планете. Необходимо также отметить и другой негативный аспект лечебного и профилактического использования антибиотиков – нарушение равновесия микробиомов макроорганизмов, значительно изменяющее этиологическую природу и структуру острых и хронических заболеваний [6-8].

В природных условиях решение проблем антибактериальной защиты обеспечивается продукцией в окружающую среду самими микроорганизмами особых небольших пептидных соединений широкого антибиотического действия [9, 10]. Важной характеристикой биологии таких пептидов являются процессы посттрансляционной модификации структуры молекул их предшественников – препропептидов, не проявляющих какой-либо детектируемой биологической активности. Антибактериальная активность появляется после химических превращений, в результате которых в составе пептидов обнаруживаются чрезвычайно редко встречающиеся аминокислоты, а сами пептиды приобретают особые свойства, которые не могут быть обеспечены типичными протеиногенными аминокислотами [11]. Ферментативные модификации таких пептидов сопряжены с процессом их секреции, что предупреждает преждевременное проявление биологической активности внутри клетки и, тем самым, киллинг продуцента. Оказавшись в активированной форме только в окружающей среде, пептиды, благодаря наличию у продуцентов систем обратного выброса, не оказывают губительного влияния на родительские клетки, а связываются, главным образом, с микроорганизмами-мишенями [12].

К настоящему времени наиболее полно изучены антибиотические пептиды, выделяемые в среду обитания грамположительными бактериями различных родов – *Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Staphylococcus, Enterococcus* и *Bacillus* [13-16].

Все исследованные катионные пептиды этих микроорганизмов характеризуются относительно небольшими размерами (менее 10 кДа), термостабильностью, высокой изоэлектрической точкой и ингибирующей активностью по отношению к широкому спектру бактерий. По своим особенностям они могут быть разделены на три класса: I-лантибиотики, II- не содержащие лантионинов пептиды небольшого размера и III- многокомпонентные бактериоцины.

Наиболее активно разрабатывается группа лантибиотиков, в структуре которых в результате пострансляционных модификаций появляются необычные аминокислоты лантионин и метиллантионин, формирующие внутримолекулярные кольцевые структуры [17]. Наличие в молекулах лантибиотиков более прочных, нежели дисульфидные, тиоэфирных связей способствует повышенной устойчивости этих пептидов к неблагоприятным факторам внешней среды и протеазам. Характерным свойством этих пептидов является амфипатичность структуры с формированием в их молекулах гидрофобных зон, облегчающих пространственную мимикрию при взаимодействии с гидрофобными мембранными образованиями [18]. Благодаря суммарному положительному заряду, лантибиотики электростатически взаимодействуют с анионными группировками клеточных оболочек бактерий, а избыток отрицательных зарядов на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны способствует их внедрению в липидные зоны с формированием при этом нерегулируемых каналов, способных пропускать различные ионы и низкомолекулярные соединения [19]. В конечном итоге это вызывает падение мембранного потенциала и гибель атакованных клеток [20].

Представленный механизм действия указывает на способность лантибиотиков облегчать поступление в бактериальные клетки других агентов, в частности, антибиотиков [21]. Действительно, при моделировании инфекционных заболеваний на животных обнаружено усиление пептидами действия бэта-лактамов и ванкомицина [22]. Катионная природа пептидов обеспечивает их выраженный аффинитет к липополисахаридам, предупреждающий развитие токсического шока при септических состояниях [23].

Необычайность свойств катионных пептидов определяет растущий интерес к этой группе соединений, который в настоящее время за рубежом принял характер исследовательского бума. Перспективы и масштабы их практического использования продемонстрированы развитыми странами внедрением в производство продуктов питания высокоэффективного пищевого консерванта лантибиотика низина, полувековое использование которого не привело к развитию и распространению резистентных к нему бактерий [24].

Представленное свидетельствует о том, что катионные пептиды могут заменить традиционные антибиотики в качестве природных лечебных факторов [25]. В этой связи поиск новых продуцентов лантибиотиков, изучение структуры этих пептидов и механизмов подавления ими роста патогенных микроорганизмов являются необходимыми звеньями разработки путей использования этого класса пептидных соединений как основы антибактериальных препаратов XXI века.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 10-04-96086-р_урал_а, 11-04-96025-р_урал_а, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 09-П-4-1019 и УрО РАН №№ 09-М-14-2002, 10-14-12-НАБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Summers A.O.* Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem // Anim. Biotechnol. – 2006. – V. 17. № 2. – P. 125-135.

2. *Wright G.D.* Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic // Curr. Opin. Microbiol. – 2010. – V. 13. № 5. – P. 589-594.

3. *Livermore, D.M.* Has the era of untreatable infections arrived? / D.M. Livermore // J. Antimicrob. Chemother. – 2009. – Vol. 64. – Suppl 1:i29-36.

4. *Giamarellou H.* Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010.– V.36. – Suppl 2:S50-54.

5. *Giamarellou H., Poulakou G.* Multidrug-resistant Gram-negative

infections: what are the treatment options? // Drugs. – 2009. – V. 69. №14. – P. 1879-1901.
6. *Sommer M.O., Dantas G.* Antibiotics and the resistant microbiome // Curr. Opin. Microbiol. – 2011. – V. 14. – P. 1-8.
7. *Blazer M.* Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria // Nature. – 2011. – V. 476. – P. 393-394.
8. *Willing, B.P., Russell S.L., Finlay B.B.* Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism // Nat. Rev. Microbiol. – 2011. – V. 9. № 4. – P. 233-243.
9. *Егоров Н.С., Баранова И.П.* Бактериоцины. Образование, свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. № 6. – С.33-40.
10. *Oscariz J., Pisabarro A.G.* Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria // Int. Microbiol. – 2001. – V. 4. № 1. – P.13-19.
11. *Xie L., van der Donk W.A.* Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2004. – V. 8. № 5. – P. 498-507.
12. *Willey J.M., van der Donk W.A.* Lantibiotics: peptides of diverse structure and function // Annu. Rev. Microbiol. – 2007. – V. 61. – P. 477-501.
13. *Chatterjee C., Paul M., Xie L., van der Donk W.A.* Biosynthesis and mode of action of lantibiotics // Chem. Rev. – 2005. – V. 105. № 2. – P. 633-684.
14. *Patton G.C., van der Donk W.A.* New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – V. 8. № 5. – P. 543-551.
15. *Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.* Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential // Curr. protein peptide science. – 2005. – V. 6. № 1. – P. 61-75.
16. *Diep D.B., Nes I.F.* Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria // Curr. Drug. Targets. – 2002. – V. 3. № 2. – P. 107-122.
17. *Goto Y., Okesli A., van der Donk W.A.* Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family // Biochemistry. – 2011. – V. 50. № 5. – P. 891-898.
18. *Wiedemann I., Benz R., Sahl H.G.* Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186. № 10. – P. 3259-3261.
19. *Borisova M.P., Korobov V.P., Lemkina L.M., Pan'kova N.V., Likhatskaia G.N.* Effect of lantibiotic warnerin on lipid bilayer membranes // Biofizika. – 2009. – Vol. 54. № 3. – P. 454-458.
20. *Korobov V.P., Titova A.V., Lemkina L.M., Poliudova T.V., Pan'kova N.V.* The dependence of the antibacterial effect of the polycationic peptide warnerin on the energy state of target cells // Mikrobiologiia. –2005. – V. 74. № 2. – P. 166-171.
21. *Korobov V.P., Titova A.V., Lemkina L.M., Mekhanoshina I.I.* Effect of peptide antibacterial factor and changes in Staphylococcus susceptibility to antibiotics // Antibiot. Khimioter. – 2002. – V. 47. № 2. – P. 11-15.
22. *Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C., Lavoie M.C.* MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens // Antimicrob Agents Chemother. – 2000. – V. 44. № 1. – P. 24-29.
23. *Rosenfeld Y., Sahl H.G., Shai Y.* Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides // Biochemistry. – 2008. – V. 47. № 24. – P. 6468-6478.
24. *Trmčić A., Monnet C., Rogelj I., Bogovič Matijašić B.* Expression of nisin genes in cheese–A quantitative real-time polymerase chain reaction approach // J. Dairy Sci. – 2011. – V. 94. № 1. – P.77-85.
25. *Hancock R.E., Sahl H.G.* Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies // Nat. Biotechnol. – 2006. – V. 24. № 12. – P. 1551-1557.

Korobov V.P.

LANTIBIOTICS ARE NATURAL ANTIBIOTICS OF WIDE SPECTRUM

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Perm, Russia, korobov@iegm.ru

Summary. One of key problems in bacterial disease treatment appears to be quick emergence and spread of infectious agent resistance to practically introduced antibiotic compounds. In this regard there seem to be attractive efficient antibiotic systems that function nearly at all the stages of the developmental route – from bacteria to a human being. Main tool of these systems are low-molecular weight peptides. Greatest concern is given here to biology and antibacterial effects of low-molecular weight cationic peptides of the lantibiotic family. Structural and mechanistic peculiarities of antibacterial lanthionine-containing peptides are presented and the prospects for their practical application are considered.

Key words: low-molecular weight peptides, lantibiotics, antibacterial action.

УДК 577.11

Кудыкина Ю.К., Шлеева М.О., Капрельянц А.С.

ПОКОЯЩИЕСЯ ФОРМЫ МИКОБАКТЕРИЙ. ЛАТЕНТНЫЙ ТУБЕРКУЛЕЗ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, arseny@inbi.ras.ru

Резюме. Латентный туберкулез – длительный асимптотический инфекционный процесс, вызываемый персистенцией *Mycobacterium tuberculosis* в теле человека. Наиболее вероятно, персистирующие микобактерии являются покоящимися формами *M. tuberculosis*, которые теряют культивируемость, иногда на длительный период. Протеомный и транскриптомный анализ обнаружили целый ряд генов и генных кластеров, экспрессия которых сопровождает переход клеток возбудителя в покоящееся состояние. Анализ результатов этих исследований позволил сформулировать несколько гипотез о перестройках в метаболических путях бактерий в процессе их физиологической трансформации. В процессе реактивации покоящихся бактерий важную роль играют секретируемые бактериями белки семейства Rpf, являющиеся ферментами, сходными с пептидогликангидролазами (литическими трансгликозилазами), принимающими участие в перестройке клеточной стенки бактерий. Предполагается новый механизм участия белков Rpf в активации покоящихся форм, состоящий в ограниченном гидролизе стенки микобактерий как первого этапа процесса реактивации. Другой обсуждаемый механизм действия Rpf связан с продуктами гидролиза клеточной стенки - низкомолекулярными соединениями муропептидами в качестве сигнальных молекул, запускающих реактивацию.

Ключевые слова: туберкулез, покоящиеся формы микобактерий, реактивация, Rpf.

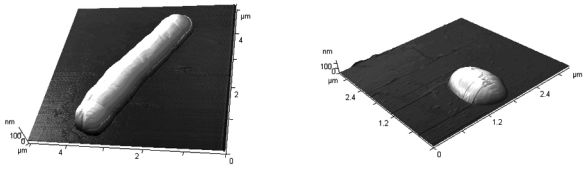
Результаты и обсуждение

Были разработаны экспериментальные модели перехода клеток двух микобактерий – быстрорастущей *Mycobacterium smegmatis* и медленно растущей *Mycobacterium tuberculosis* в покоящееся, «некультивирумое» состояние после воздействия постепенно снижающегося значения pH. По данным атомной силовой микроскопии размеры вегетативных клеток в экспоненциальной фазе роста составляли в среднем 3,7 × 0,8 мкм и значительно отличались от размеров покоящихся клеток – 1,2 × 0,9 мкм (рис. 1). Такие клетки не образовывали колоний на твердых средах, но могли быть реактивированы в жидкой среде. На основании выявленных характеристик (низкий уровень метаболизма, отсутствие дыхания, устойчивость к воздействию высоких температур и антибиотиков) полученные овоидные формы микобактерий можно отнести к покоящимся формам.

Ранее было показано, что секретируемые бактериями белки семейства Rpf промотируют реактивацию «некультивируемых» клеток. Однако трудно себе представить, что в макрофагах имеется достаточное количество белков Rpf для реактивации, учитывая малое количество клеток микобактерий, захваченных макрофагом. Поэтому, вероятно, в организме хозяина действуют и другие факторы реактивации, среди которых могут быть белки, компоненты клеточных стенок или факторы иммунной системы. В процессе исследования путей реактивации покоящихся микобактерий было выявлено участие в инициации этого процесса таких низкомолекулярных компонентов, как свободные ненасыщенные жирные кислоты и цАМФ (рис. 2). Эти вещества присутствуют в достаточном количестве в клетках хозяина и могут запускать процесс реактивации микобактерий с участием белков семейства Rpf.

Таким образом, впервые была получена экспериментальная модель, которая имитирует латентное состояние in vivo и выход из него. Это открывает перспективы изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе явления латентности, что необходимо для борьбы и профилактики этого вида туберкулезной инфекции.

Атомно-силовая микроскопия клеток *M. smegmatis*



Активная клетка Покоящаяся клетка

Рис. 1

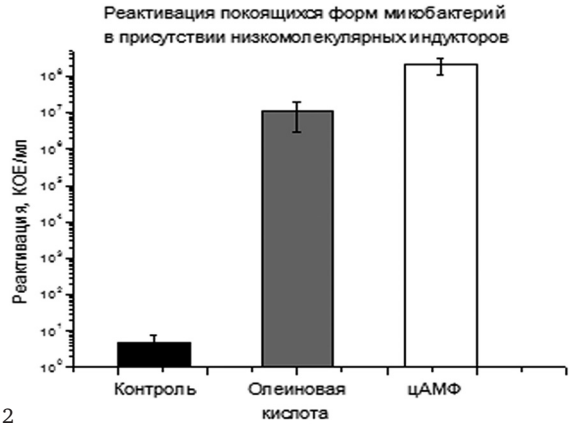


Рис. 2

Работа была поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология», ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы ГК №14.740.11.0246 и ГК №14.740.11.1056, а также РФФИ №11-04-00713-а и №11-04-01440-а.

Kudykina Yu.K., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S.

DORMANT CELLS OF MYCOBACTERIA. LATENT TUBERCULOSIS

A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Moscow, Russia, arseny@inbi.ras.ru

Summary. Latent tuberculosis is asymptotic long lasting infection. More likely persisting (dormant) bacteria are non-cultureble forms of *M. tuberculosis*. Proteomic and transcriptomic analysis reveal specific genes and gene clusters which are up-regulated during bacterial transition to dormant state. Several hypothesis on metabolic pathways participated in this transition have been formulated. Secreted mycobacterial proteins belonging to Rpf family take part in resuscitation of dormant forms. These proteins as peptydoglycan hydrolyses participate in remodeling of bacterial cell wall. It is suggested that Rpf may induce cell reactivation by limited hydrolysis of cell walls resulted in the dispersion of cellular aggregates. Another possible mechanism of Rpf activity may be connected with the products of Rpf-dependent hydrolysis of peptidoglycan- muropeptides which could serve as signaling molecules.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, dormancy, resuscitation, Rpf.

УДК 579.242

Мулюкин А.Л.

СПОСОБЫ ВЫЖИВАНИЯ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, г. Москва, Россия, andlm@mail.ru

Резюме. Представлены результаты изучения формирования цистоподобных клеток посредством неспорообразующих клеток бактерий, предназначенных для выживаемости. Показано, что цистоподобные клетки обладают следующими свойствами, присущими покоящимся прокариотическим формам: поддержанием жизнеспособности в течение длительных периодов; экспериментально не детектируемой метаболической активностью; повышенной резистентностью к повреждающим агентам, специфической микроструктурой, отличающейся от предшествующих безспоровых клеток, а также формированием в эволюционных циклах микробных культур. Предполагается, что гибкая стратегия выживаемости неспорообразующих бактерий является также следствием внутривидового и внутрипопуляционного разнообразия их покоящихся клеток, чьи свойства (морфологическая организация, способность возобновлять рост, резистентность к вредным факторам) зависят от условий их формирования. Использованием методов прямой микроскопии обнаружено, что цистоподобные клетки находятся в пробах многовековой вечной мерзлоты. Это позволяет надеяться, что некоторые подходы могут повысить детекцию покоящихся клеток посредством специальных культуральных методов и возможностей ПЦР.

Ключевые слова: выживаемость, неспорообразующие бактерии, состояние покоя, цистоподобные клетки.

При изменении условий окружающей среды (исчерпании питательных веществ, источников энергии и пространства) происходит или снижение скорости роста микроорганизмов, или стратегия роста заменяется стратегией выживания и перехода в состояние покоя. Специализированные покоящиеся формы (споры, цисты и др.) известны лишь для крайне узкого круга прокариот (5-10% от общего числа описанных таксонов). Поэтому вопрос о способах длительного выживания у подавляющего большинства видов бактерий, не имеющих таких форм покоя, остается актуальным для микробиологии, микробной экологии, медицины [1]. Применительно к неспорообразующим бактериям трактовка термина «покой» широка и охватывает: клетки культур стационарной фазы [2]; жизнеспособные некультивируемые клетки [3-5]; неактивные клетки в биопленках [6]; антибиотико-устойчивые персисторы [7]. С этими нетождественными состояниями пролиферативного и метаболического покоя, однако, не ассоциируют стратегию длительного переживания бактерий в природных условиях.

Облигатное свойство всех бактерий формировать в циклах развития их культур покоящиеся «микроцисты», обеспечивающие длительное выживание вида, постулировалось Биссетом [8]. Экспериментальные доказательства справедливости этой гипотезы – образование клеток цистоподобного типа, были получены в более поздних исследованиях, проводимых в ИНМИ РАН и других институтах. Основанием для отнесения цистоподобных клеток к покоящимся формам является доказательство: 1) длительного сохранения их способности к репродукции; 2) резко сниженной или экспериментально не выявляемой метаболической активности; 3) повышенной устойчивости к повреждающим воздействиям; 4) отличий в ультраструктурной организации от вегетативных клеток; 5) их образования в циклах развития культур. Эти критерии соответствуют определению, принятому в литературе по спорам [9]. Образование цистоподобных клеток (ЦПК), обладающих вышеперечисленными признаками покоящихся форм прокариот, было доказано для широкого круга неспорообразующих грамположительных и грамотрицательных бактерий [1, 10]. Для массового образования ЦПК в лабораторных культурах разработаны различные и воспроизводимые условия, имитирующие природные. Доказано, что каковы бы ни были условия роста бактериальных культур, циклы их развития всегда завершаются образованием покоящихся форм [10].

Установлено, что в разных условиях развития в культурах одного и того же вида неспорообразующих бактерий образуются покоящиеся формы различных морфологических типов и с разной степенью устойчивости к повреждающим воздействиям. В этом проявляется внутривидовое разнообразие форм покоя. С другой стороны, доказана внутрипопуляционная гетерогенность покоящихся форм одного и того же типа (ЦПК) по устойчивости; отклику на ростовые условия; потребности в специфических условиях для прорастания. Внутрипопуляционное разнообразие ЦПК также проявляется в расширении спектра фенотипической диссоциации популяций, прорастающих из

этих покоящихся форм. Это сопровождается появлением и развитием фенотипов, отличных от доминантного типа по колониально- морфологическим, ростовым, биохимическим признакам и устойчивости к антимикробным агентам [10].

Для повышения эффективности экологического мониторинга разработаны диагностические критерии обнаружения ЦПК в природных образцах *in situ* прямыми микроскопическими методами. Критерии основаны на учете особенностей ультраструктурной организации покоящихся форм и соотношения в них ряда биогенных элементов (Ca/K, P/S) [10-12]. Результаты этих исследований позволили заключить, что выживание неспорообразующих бактерий в древних (до 2 млн лет) вечномерзлых породах обеспечивается за счет ЦПК. Для покоящихся форм, не образующих колонии на обычных средах, применены разные методы учета жизнеспособных клеток и вариации состава сред для снятия эффекта субстрат-ускоренной смерти и защиты от окислительного стресса. Показана возможность повышения чувствительности ПЦР при использовании покоящихся форм бактерий как источников матриц ДНК [10].

Постулируется, что внутривидовое и внутрипопуляционное разнообразие цистоподобных покоящихся форм бактерий обеспечивает длительное, не сопоставимое со временем генерации клеток, выживание вида в природе при неблагоприятных для роста условиях и его расселение при наступлении ситуаций, предусматривающих возможность реверсии к росту.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И.* Механизмы выживания бактерий. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
2. *Vulić M., Kolter R.* Evolutionary cheating in *Escherichia coli* stationary phase cul-tures // Genetics. – 2001. – V. 158. – P. 519-526.
3. *Roszak D.B., Colwell R.R.* Survival strategies of bacteria in the natural environment // Microbiol. Rev. – 1987. – V. 51. – P. 365-379.
4. *Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R.* Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 73. – P. 169-187.
5. *Oliver J.D.* The viable but nonculturable bacteria // J. Microbiol. – 2005. –V. 43. – P. 93-100.
6. *Xu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C.-T., McFeters G.A.* Spatial physiological het-erogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability // Appl. Env. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 4035-4039.
7. *Lewis K.* Persister cells, dormancy and infectious disease // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – V. 5. – P. 48-56.
8. *Bisset K.A.* Bacteria, 1952. – E. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh, Scotland.
9. *Sudo S.Z., Dworkin M.* Comparative biology of procaryotic resting cells // Adv. Microbiol. Physiol. – 1973. – V. 9. – P. 153-224.
10. *Мулюкин А.Л.* Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: свойства, разнообразие, диагностика // Дисс. … докт. биол. наук. – М.: ИНМИ РАН, 2010. – 349 с.
11. *Soina V., Mulyukin A., Demkina E., Vorobyova E., El-Registan G.* The structure of resting microbial populations in soil and subsoil permafrost // Astrobiology. – 2004. V. 4. – P. 345-358.
12. *Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Воробьева Е.А., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И.* Применение метода рентгеновского микроанализа для выявления и предварительной оценки физиологического состояния микроорганизмов в объектах окружающей среды // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – С. 836-848.

Mulyukin A.L.

SURVIVAL OF NON-SPORE-FORMING BACTERIA: FORMS AND MECHANISMS

S.N. Winogradsky Institute of Microbiology,

Moscow, Russia, andlm@mail.ru

Summary. This communication has a focus on the formation of cyst-like cells by various non-spore-forming bacteria intended for survival. Cyst-like cells possess the features inherent to dormant prokaryotic forms: 1) maintenance of viability for prolonged periods; 2) experimentally undetectable metabolic activity; 3) elevated resistance to damaging agents; 4) specific fine structure, distinct from preceding vegetative cells; and 5) are formed in development cycles of microbial cultures. The flexi-ble survival strategy of non-spore-forming bacteria is regarded to be due also to intraspecies and in-trapopulation diversity of their dormant cells whose properties (the morphological organization, the ability to resume the growth, resistance to deleterious factors) depend upon the conditions of their formation. With the use of direct microscopy methods, cyst-like cells were found in samples of an-cient permafrost, and some approaches were proposed to improve the detection of dormant cells by cultural methods and PCR.

Key words: survival, non-spore-forming bacteria, dormant state, cyst-like cells.

УДК 579, 851

Сибгатуллина Э.Э., Зиганшин А.М.

СПОСОБ УТИЛИЗАЦИИ ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОГАЗОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, elvira051088@gmail.com

Резюме. В ходе исследования разработан эффективный способ утилизации послеспиртовой барды в анаэробных условиях с получением биогаза и создано высокоактивное по отношению к барде микробное сообщество. Полученные результаты работы могут быть применены на спиртовых заводах при утилизации послеспиртовой барды, а получаемый биогаз может быть использован для частичного отопления самих заводов, а также генерации электричества.

Ключевые слова: послеспиртовая барда, биогаз, метанобразующие бактерии.

В последние годы в пищевых перерабатывающих отраслях промышленности остро стоит проблема переработки отходов производства, в частности, послеспиртовой барды в спиртовой промышленности. Ежегодно предприятия спиртовой промышленности сбрасывают на поля фильтрации, реки и водоёмы порядка 10 миллионов тонн барды, создавая сложную экологическую обстановку на прилегающих территориях [1]. Реализация барды на предприятиях животноводческого комплекса в нашей стране в последние десятилетия сведена к минимуму из-за резкого снижения поголовья скота. Кроме этого, в России планируется строительство заводов по переработке зерна для получения биоэтанола, что приведет к увеличению производственных отходов в огромных масштабах. Актуальность вопроса переработки или утилизации барды предприятий спиртовой отрасли очевидна. Экологической причиной и рядом других причин, в том числе экономических, обоснована научная заинтересованность данной проблемой.

Органические отходы спиртовой промышленности представляют собой хороший потенциальный источник энергии, большое количество питательных веществ которых может быть подвергнуто биогазовой технологии. Биогаз является экологичным источником энергии, получение которого является одним из активных направлений современной экологической биотехнологии. В частности применение биотоплива способствует сокращению выбросов в атмосферу парниковых газов – углекислого газа и метана [2, 3]. Разработка технологий рационального использования отходов спиртовой промышленности, в частности, с получением биогаза и изучение микробных сообществ, участвующих в этом процессе, является актуальной проблемой.

В данной работе послеспиртовая барда была подвергнута анаэробной конверсии в лабораторных мезофильных биогазовых реакторах и были идентифицированы метаногенные сообщества, участвующие в данном процессе. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование архейных генов 16S рРНК позволили нам идентифицировать стабильные мезофильные архейные сообщества, участвующие в анаэробной переработке послеспиртовой барды с образованием биогаза. Представители сообщества метаногенов, принимающие активное участие в анаэробной деградации барды, были отнесены к следующим родам – *Methanoculleus, Methanospirillum, Methanosaeta, Methanosarcina, Methanomethylovorans*. Показано, что внесение в био-

реактор $FeCl_3$ для осаждения токсичного H_2S в виде нетоксичного сульфида железа оказало позитивное влияние на развитие высокоактивного архейного сообщества с повышенной эффективностью анаэробной деструкции субстрата, что дополнительно сопровождалось повышенным выходом биогаза.

На основе микробных технологий деградации отходов спиртовой промышленности был разработан способ, позволяющий эффективно утилизировать послеспиртовую барду и очищать сточную воду до степени использования её в технических целях предприятия или сброса в городские коллекторы. Научные результаты данного исследования означают прогресс в решении проблемы утилизации отходов на спиртовых заводах, а биогаз, получаемый в ходе анаэробной деструкции барды, может быть использован в качестве экологичного источника энергии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Фадеева И.В., Атыкян Н.А., Ревин В.В.* Отработка условий биоконверсии отходов спиртовой промышленности с помощью молочнокислых бактерий и базидиальных грибов // Вестник Нижегородского университета. – 2009. – № 6 (1). – С. 113–119.

2. *Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H.* Biofuels from microbes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 77. N. 1. – P. 23–35.

3. *Huber G.W., Iborra S., Corma A.* Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering // Chem. Rev. – 2006. – V. 106. N. 9. – P. 4044–4098.

Sibgatullina E.E., Ziganshin A.M.

THE DISPOSAL DISTILLERY GRAINS USING BIOGAS TECHNOLOGY

Kazan (Volga) Federal University,

Kazan, Russia, elvira051088@gmail.com

Summary. In this study, the effective method of disposal distillery grains under anaerobic conditions to produce biogas was developed, and the highly active microbial community against distillery grains was created. The obtained results can be applied to recycling distillery grains, and the biogas can be used for partial heating plants themselves, as well as generating electricity.

Key words: distillery grains, biogas, methane-producing bacteria.

УДК 608.5:347.77

Скородумова О.В.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПАТЕНТОВАНИЮ ОБЪЕКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный институт промышленной собственности»,

г. Москва, Россия, o.skorodumova@yandex.ru

Резюме. Категории патентоспособных объектов изобретений, относящихся к биотехнологии. Депонирование микроорганизмов в целях национальной патентной процедуры как условие для признания штамма микроорганизма (или средства на его основе) соответствующим условию «промышленная применимость».

Ключевые слова: объект изобретения, патентование, депонирование, патентоспособность.

Согласно Ст.1349 части 4 Гражданского Кодекса Российской Федерации от 18.12.2006 г. (далее – Кодекс) в число объектов патентных прав включены изобретения как результаты интеллектуальной деятельности в научно-технической сфере, обеспечивающие получение определенного технического результата и отвечающие установленным требованиям. В качестве изобретения охраняется техническое решение в любой области, относящееся к продукту или способу. Для признания изобретения патентоспособным необходимо, чтобы оно было новым, имело изобретательский уровень и соответствовало требованию промышленной применимости (все три условия патентоспособности обязательны для выдачи патента на изобретение).

Технический результат изобретения – это характеристика технического эффекта, проявляющегося в результате реализации изобретения и создающего вклад изобретения в уровень техники в конкретной области.

Объектами изобретений могут быть: способ как процесс осуществления действий над материальным объектом с помощью материальных средств (устройств, веществ, биологических объектов) или продукт, в частности, вещество, устройство, штамм микроорганизма, культуры клеток растений или животных, генетическая конструкция согласно п.10.4.1 Административного регламента исполнения Федеральной Службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам государственной функции по организации приема заявок на изобретение и их рассмотрения, экспертизы и выдачи в установленном порядке патентов Российской Федерации на изобретение, утвержденного приказом Министерства образования и науки РФ №327 от 29 октября 2008 г. (далее – Регламент). Данный перечень по своей сути является открытым и по мере накопления практических и методологических аспектов экспертизы изобретений будет расширяться, например, за счет объектов изобретений, относящихся к генной инженерии.

Необходимо отметить, что объектами патентных прав не могут быть:

1) способы клонирования человека,

2) способы модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека,

3) использование человеческих эмбрионов в промышленных и коммерческих целях.

4) иные решения, противоречащие общественным интересам, принципам гуманности и морали.

Не предоставляется правовая охрана также сортам растений, породам животных и биологическим способам их получения, за исключением микробиологических способов и продуктов, полученных такими способами.

Под определение «продукт» в настоящее время подпадают все объекты биотехнологии, относимые ранее к категориям «вещество» или «штамм», кроме того, впервые созданы условия для прямой защиты генетически модифицированных биообъектов. К таким биообъектам относят трансформированные (генетически измененные) прокариотические и эукариотические клетки, трансгенные растения и трансгенные животные.

Основным характеризующим признаком для генетически измененного биообъекта является так называемый трансформирующий элемент, охарактеризованный, как правило, через нуклеотидную последовательность генетического материала, введенного в биообъект.

Правовая охрана этих объектов предусмотрена в рамках объекта «генетическая конструкция» (подпункт (7) пункта 10.7.4.3 Регламента). Для характеристики собственно объекта «генетическая конструкция» как такового привлекаются признаки, являющиеся конструктивными элементами (например, энхансер, промотор, терминатор, фрагмент чужеродного гена и т.п.), а также связи конструктивных элементов, взаимное расположение элементов и иные.

Для трансформированной клетки, которая ранее в отдельных случаях могла быть защищена как объект изобретения «штамм», в качестве основного признака целесообразно использовать трансформирующий элемент, охарактеризованный, например, через нуклеотидную последовательность вводимого генетического материала. Другими важными признаками являются приобретаемые клеткой свойства, происхождение клетки, таксономические признаки клетки, особенности мутации исходного генома и иные, достаточные для того, чтобы отличить данную клетку от другой. Необходимо подчеркнуть, что указание назначения или приобретаемых новых свойств трансформированной клетки в формуле изобретения обязательно, если назначение трансформированной клетки отличается от назначения (функции) трансформирующего элемента.

Патентуемыми в России стали трансгенные растения и трансгенные животные. Трансгенные растения и животные (не представляющие собой сорт растений или породу животных, охрана которых регламентируется Законом о селекционных достижениях) составляют особую группу живых организмов, которые отличаются от аналогичных организмов, существующих в природе. Характерной чертой этих объектов является то, что на их основе можно получить модифицированный продукт, предназначенный в ряде случаев для прямого потребления человеком в качестве пищевого продукта или лекарственного средства.

Для трансгенного растения как объекта изобретения наиболее

важными признаками являются: указание того, какой именно ген или другой участок генома модифицирован или какой именно генетический материал введен в растение, а также приобретаемые растением признаки (свойства). В качестве признаков данного объекта обычно указывают происхождение растения, его таксономическую принадлежность и иные характеристики, достаточные для того, чтобы отличить данное растение от другого.

Основными характеристиками такого объекта изобретения, как трансгенное животное, являются указание гена и/или ДНК, введенного в геном животного и кодирующего или экспрессирующего целевой продукт, приобретаемые животным признаки, продуцируемый животным модифицированный продукт, а также таксономическая принадлежность животного и иные характеристики, позволяющие отличить данное животное от другого.

Помимо вышеуказанных, круг патентоспособных объектов включает традиционные биотехнологические продукты, характеризующиеся установленной или частично установленной структурой, такие как последовательности нуклеиновых кислот, белки, пептиды, генетические конструкции (которые характеризуются, в первую очередь, нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, наличием и/или порядком расположения составных элементов) (п.10.8.3 Регламента). Получаемые на их основе или с их участием биопрепараты, вакцины, композиции, лекарственные средства, также рассматриваемые как объект изобретения «вещество», также могут быть объектами изобретений.

Такой традиционный объект изобретения как «штамм микроорганизма» может быть признан патентоспособным только в случае осуществления его депонирования при соблюдении ряда условий, определенных в п.10.7.4.5.(3) Регламента (это требование не является обязательным для рекомбинантных штаммов, полученных с помощью генноинженерных методик). В настоящее время формируется перечень уполномоченных национальных коллекций-депозитариев для депонирования штаммов для целей патентной процедуры, в данный период депонирование можно осуществлять в коллекциях, имеющих статус Международного Органа для депонирования (МОД): ВКПМ, ВКМ и коллекция ФГУП Государственного научного центра по антибиотикам.

Охарактеризованные выше подходы к патентованию биотехнологических изобретений в Российской Федерации соответствуют мировой практике патентования.

Skorodumova O.V.

MODERN APPROACHES TO BIOTECHNOLOGICAL OBJECTS PATENTING IN RUSSIAN FEDERATION

Federal Institute of Industrial Property,

Moscow, Russia, o.skorodumova@yandex.ru

Summary. Categories of patentable biotechnology-related inventions. Deposit of microorganisms for the purposes of the national patent procedure as a strain or biopreparation “industrial applicability” patentability condition acceptance factor.

Key words: invention, patenting, deposit, patentability.

УДК 576.36:579.25

Ткаченко А.Г.

«ОРГАНЫ ЧУВСТВ» У МИКРООРГАНИЗМОВ И МЕХАНИЗМЫ ПРОВЕДЕНИЯ СИГНАЛОВ СТРЕССА

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, agtkachenko@iegm.ru

Резюме. Эффективность клеточных ответов на действие стрессорных факторов зависит от степени специфичности сенсорных механизмов, участвующих в восприятии и проведении сигналов стресса.

Ключевые слова: биосенсоры, системы проведения сигнала, стресс.

Принято выделять несколько основных типов систем восприятия и проведения сигналов стресса, которые имеют общие структурно-функциональные особенности.

1. Двухкомпонентная система проведения сигнала [1]

Типичные двухкомпонентные системы состоят из гистидинкиназного сенсора и родственного регулятора ответа. В ответ на специфический сигнал стресса димерная гистидинкиназа подвергается АТФ-зависимому аутофосфорилированию по специфическому гистидиновому остатку и далее передает фосфатную группу на аспартильный остаток родственного регулятора ответа, изменяя его транскрипционные, ферментативные или механические свойства. Белок-регулятор ответа в своей активной фосфорилированной форме связывается с комплементарными для него последовательностями, расположенными вблизи промоторов регулируемых им генов-мишеней и активирует их транскрипцию.

2. Специфические транскрипционные регуляторы [2]

Специфические транскрипционные регуляторы принципиально отличаются от двухкомпонентных систем как своей структурой, так и механизмом передачи сигнала. В одной белковой молекуле у них сосредоточены функции как сенсора, так и транскрипционного регулятора. Примерами такого рода являются транскрипционные активаторы ответа на окислительный стресс и анаэробиоз, OxyR, SoxRS, FNR и другие.

3. Механизм проведения сигнала по типу Quorum sensing [3]

Данный механизм принципиально отличается от двухкомпонентных систем проведения сигнала тем, что во время передачи сигнала из среды в цитоплазму не происходит химической модификации сигнальной молекулы, участвующей в этом процессе. Термин «Quorum Sensing» (QS, ощущение кворума), использованный для обозначения механизмов такого типа, впервые был предложен Фукуа. В основе такого способа передачи сигнала лежит продуцирование низкомолекулярной сигнальной молекулы, внеклеточная концентрация которой связана с плотностью популяции продуцирующего организма. Бактерии общаются друг с другом посредством множества сигнальных молекул, которые участвуют в процессах биолюминесценции, вирулентности, биопленкообразовании, споруляции, компетентности для потребления ДНК, программируемой клеточной смерти и других.

4. Рибопереключатели [4]]

Этот тип биосенсоров представляет собой участки мРНК, способные образовывать вторичные структуры, изменяющие конформацию под воздействием специфических метаболических факторов и других лигандов. В процессе регуляции транскрипции или трансляции они могут действовать по принципу репрессии или активации.

5. Вторичные структуры информационных РНК

Образование двунитевых участков мРНК в области инициации трансляции часто используется в качестве биосенсора стрессорных факторов. Их плавление происходит под воздействием стрессорного фактора, что запускает синтез белков-регуляторов. Этот механизм используются в качестве сенсора при таких видах стресса как тепловой шок, голодание, стационарная фаза [5].

6. Вторичные структуры ДНК

Функции сенсора у микроорганизмов могут выполнять также вторичные структуры ДНК. Их образование, как правило, происходит в области генов адаптации к стрессу и становится возможным при участии ДНК-связывающих гистоноподобных белков, таких как H-NS [6]. В нормальных условиях роста вторичные структуры ДНК препятствуют транскрипции, но разрушаются при воздействии стрессорных факторов, таких как тепловой или осмотический виды шока.

7. Топологическое состояние ДНК [7].

Уровень сверхспирализации ДНК напрямую зависит от условий среды, окружающей клетку, которые опосредуются, в частности, через ее энергетическое состояние. Поэтому топологическое состояние ДНК рассматривается как чувствительный глобальный биосенсор, определяющий функционирование генома клетки в целом. Промоторы различных генов имеют индивидуальные особенности. Поэтому каждый из них характеризуется своей собственной оптимальной величиной сверспирализации, при которой эффективность связывания промотора с РНК-полимеразой максимальна.

Таким образом, функционирование сенсорных систем в клетках микроорганизмов обеспечивает восприятие ими состояния окружающих условий среды, что способствует адекватному использованию механизмов адаптации и выживанию в условиях стресса.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 11-04-96001) и программой президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 01200963690).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hellingwerf K. J., Crielaard W. C., deMattos M. J., Hoff W. D., Kort R., Verhamme D. T., AvignoneRossa C.* Current topics in signal transduction in bacteria //

Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M. – 1998. – V. 74. – N4. – P. 211-227.
2. *Zheng M., Storz G.* Redox sensing by prokaryotic transcription factors // Biochem. Pharmacol. – 2000. V. 59. – N 1. – P. 1-6.
3. *Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.* «Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators» // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176. –N 2. – P. 269-275.
4. *Sudarsan N., Lee E.R., Weinberg Z., Moy R.H., Kim J.N., Link K.H., Breaker R.R.* Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP // Science. –2008. – V. 321. – N 5887. – P. 411-413.
5. *Yura T., Kanemori M., Morita M.T.* The heat shock response: regulation and function / in: Bacterial stress Responses, ed. G. Storz, R. Hengge-Aronis // ASM Press, Washington, D.C. Washington. – 2000. – P. 3-18.
6. *Rajkumari K., Gowrishankar J.* In vivo expression from the RpoS-dependent P1 promoter of the osmotically regulated proU operon in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium: Activation by rho and hns mutations and by cold stress // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. N. 22. –P. 6543-6550.
7. *Cozzarelli N.R.* DNA gyrase and the supercoiling of DNA // Science. – 1980. – V. 207. N 4434. – P. 953-960.

Tkachenko A.G.

"SENSE ORGANS" IN MICROORGANISMS AND MECHANISMS OF THE STRESS SIGNAL TRANSDUCTION

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Perm, Russia, agtkachenko@iegm.ru

Summary. The efficiency of cell responses to stress factors depends on the value of specificity of sensor mechanisms, which participate in the acceptation and transduction of stress signals.

Key words: biosensors, signal-transducing systems, stress.

УДК 579.243, 57.017.3

Эль-Регистан Г.И.

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии
имени С.Н. Виноградского РАН, г. Москва, Россия, el-reg@yandex.ru

Резюме. Рассмотрены типы адаптации микроорганизмов к изменениям окружающей среды, находящимся в зоне толерантности для вида или выходящим за ее пределы. Приведены примеры регуляции механизмов адаптации (на генетическом и биохимическом уровнях) и контроля стрессового ответа (на клеточном и популяционном уровнях). Обобщена информация о функциях внеклеточных ауторегуляторов, концентрационно контролирующих адаптационные реакции микробной популяции: клеточное деление; гибель клеток (автолиз, апоптоз); образование покоящихся форм; изменение спектра диссоциантов. Проанализированы адаптогенные и стресс-потенциирующие функции ауторегуляторов и их видонеспецифичность в эффективности адаптации микробных популяций, обеспечивающей выживание сообществ и результативность симбиозов с многоклеточными организмами.

Ключевые слова: адаптация, микроорганизмы, популяция, внеклеточные ауторегуляторы.

Постоянное изменение и развитие микробных систем в соответствии с изменениями окружающей среды является одним из их сущностных свойств и обеспечивается совокупностью приспособительных генетических, биохимических, физиологических и морфологических реакций, способствующих продолжению функционирования или выживанию микробной популяции как единого организма. В зависимости от природы изменяющегося фактора (стрессорного воздействия) и уровня изменения типируют виды стрессоров и стрессовых ответов. Реакции адаптации (приспособления к, защиты от стрессора) осуществляются на химическом, молекулярно-биологическом, клеточном и популяционном уровнях и на всех уровнях контролируются специфическими внеклеточными низкомолекулярными метаболитами различной химической природы. Основной функцией этих (ауто)регуляторов – адаптогенов – является обеспечение межклеточных взаимодействий, направленных на формирование обобщенного ответа популяции для ее сохранения в изменившихся или неростовых условиях при «запланированных» (в онтогенезе организма) и «незапланированных» (случайных) стрессах. Необходимым условием мобилизации популяционного адаптогенного ресурса является повышение вне- и внутриклеточных концентраций (ауто)регуляторов, индуцированное воздействиями стрессоров.

На химическом и молекулярно-биологическом уровнях (ауто)регуляторы посредством физико-химических взаимодействий с биополимерами (в т.ч. с регуляторными белками) модифицируют их структуру, что обусловливает повышение стабильности и модуляцию функциональной активности. Это приводит к изменению скорости метаболических реакций и инициирует новые процессы (например, активирует или индуцирует экспрессию стрессовых регулонов, генов). На клеточном уровне существенную роль в эффективности адаптации играют ауторегуляторы с функциями адаптогенов или стресс-потенциирующих агентов, которые контролируют: скорость клеточного деления; формирование клеток-персисторов; гибель (автолиз или апоптоз) части клеточной популяции; образование переживающих покоящихся форм оставшимися интактными клетками. На популяционном уровне регуляторный контроль адаптации выражается в изменениях диссоциативного спектра популяции, которые реализуют ее потенциальный приспособительный ресурс, особенно важный для результативности симбиозов. Функциями (ауто)регуляторов является контроль фазовых переходов, расширение спектра диссоциантов за счет индукции их выщепления и селективного отбора в новых условиях. Гетерогенность микробной популяции по признакам (свойствам) продуктивности (ауто)регуляторов и чувствительности к ним клеток-реципиентов обусловливает субпопуляционную иерархию в стрессовом ответе.

Основные направления адаптации, контролируемые внеклеточными (ауто)регуляторами: 1) поддержание адекватной структурной организации и функциональной активности клеточных мембран; 2) конформационные изменения клеточных биополимеров; 3) антиоксидантная неферментативная защита клеточных структур; 4) индукция стрессовых регулонов; 5) приобретение повышенной устойчивости к повреждающим воздействиям; 6) регуляция численности клеточной популяции; 7) адекватное обеспечение внутрипопуляционной фенотипической вариабельности.

Будучи невидоспецифичными, эти (ауто)регуляторы на уровне сообщества образуют кооперативную систему, которая контролирует его устойчивость в стрессовых условиях. При видонеспецифичности регуляторов-адаптогенов диапазон чувствительности к ним клеток различных таксонов очень широк и варьирует от 2 до 12 раз, что обеспечивает функционирование кооперативной регуляторной системы наряду с трофической регуляцией в контроле развития и стабильного функционирования сообщества (симбиоза).

Таким образом, в природных микробных системах (биопленках, сообществах, симбиозах с многоклеточными организмами) формируется пул внеклеточных невидоспецифичных низкомолекулярных метаболитов, не участвующих непосредственно в обменных процессах, функцией которых является регуляция коллективного ответа системы на изменения окружающей среды, находящиеся в диапазоне толерантности для компонентов системы или выходящие за ее пределы.

El-Registan G.I.

ADAPTATION OF MICROORGANISMS: POPULATION ASPECTS

S.N. Winogradsky Institute of Microbiology,
Moscow, Russia, el-reg@yandex.ru

Summary. This communication is focused on the adaptation of microorganisms to environmental changes within or beyond the species-specific tolerance range. Some examples are considered on the regulation of adaptative mechanisms (at the genetic and biochemical levels) and stress response control (at the cellular and population levels). Information is generalized about the functions of extracellular autoregulatory factors, which control (in a concentration-dependent manner) the adaptative reactions of microbial populations: cell division, cell death (autolysis, apoptosis); formation of resting cells; changes in the spectrum of phase variants. Species-non-specific adaptogenic and stress-potentiating functions of autoregulators are analyzed from standpoints of survival of microbial communities and symbiotic relations between microbes and mulicellular organisms.

Key words: adaptation, microorganisms, population, extracellular autoregulators.

УДК 579.25+577.213.3+579.84

Ананьина Л.Н., Плотникова Е.Г.

НОВАЯ СИСТЕМА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ *ect*-ГЕНОВ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *HALOMONADACEAE*

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, ludaananyina@mail.ru

Резюме. На основе анализа известных нуклеотидных последовательностей оперона, кодирующего ферменты синтеза эктоина, разработана и оптимизирована пара вырожденных праймеров для амплификации и секвенирования участка, включающего фрагменты генов *ectA* и *ectB*, у представителей разных родов семейства *Halomonadaceae*.

Ключевые слова: галофильные бактерии, *Halomonadaceae*, *ect*-гены, ПЦР.

Семейство *Halomonadaceae* формирует отдельную филогенетическую линию в классе *Gammaproteobacteria* согласно анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. В настоящее время семейство объединяет 9 родов: *Zymobacter, Carnimonas, Cobetia, Halotalea, Modicisalibacter, Salinicola, Kushneria, Chromohalobacter* и наиболее многочисленный род *Halomonas*, включающий более полусотни видов. Список новых видов продолжает активно пополняться, приводя к увеличению межвидового сходства 16S рДНК до уровня превышающего 99%, что затрудняет идентификацию бактерий до видов на основе этого метода. Следовательно, необходим поиск генов, способных выполнять функцию филогенетических маркеров и дающих высокое разрешение на таксономических уровнях низкого порядка. В качестве такой альтернативы могут выступать гены, кодирующие различные функции метаболизма, например, ферменты синтеза эктоина [1] — широко распространенного прокариотического осмопротектора. Однако база данных нуклеотидных последовательностей *ect*-генов узаконенных видов семейства *Halomonadaceae* чрезвычайно мала и требует пополнения. Для этого необходимо использовать эффективные праймеры. Из литературных источников известны две пары вырожденных праймеров, разработанные на основе нуклеотидных последовательностей *ect*-генов галомонад [1, 2]. Проведенный нами анализ данных праймеров *in silico* показал, что один из олигонуклеотидов каждой пары имеет значительное несовпадение в 3`-области с *ect*-генами *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T (AJ011103). Отсюда следует очевидная потребность в новой эффективной системе олигонуклеотидов для амплификации и секвенирования *ect*-генов.

Целью данной работы явилась разработка и оптимизация системы вырожденных праймеров для амплификации и секвенирования *ect*-генов у представителей семейства *Halomonadaceae*.

Для выполнения поставленной цели был проведен поиск полных нуклеотидных последовательностей *ect*-оперона представителей разных родов семейства *Halomonadaceae* в публичных базах данных, который выявил пять таковых: *Halomonas elongata* DSM 2581T (AF031489), *Ch. salexigens* DSM 3043T (AJ011103), *Halomonas* sp. BYS-1 (DQ017757), *Halomonas* sp. NJ223 (DQ886907), *Chromohalobacter* sp. NJS-2 (EF486239) и *Cobetia marina* CICC10367 (FJ497051). Обнаруженные нуклеотидные последовательности были выровнены с использованием программы CLUSTALX2. На основе полученных данных было выявлено четыре консервативных участка, к которым были сконструированы олигонуклеотиды. С целью формирования пар для каждого олигонуклеотида были рассчитаны температура плавления и ГЦ-состав с помощью пакета программ Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basic.northwestern.edu). Наименьшей разницей данных критериев характеризовались следующие праймеры: прямой ectF718 (5`-CMACCCAGTTYCGYGATASCTGC-3`), позиции 372-394 *ect*A-гена, и обратный ectR2050 (5`-CCGTTRTAYT GICCVGGCTTCCA-3`), позиции 861-883 *ect*B-гена *Ch. salexigens* DSM 3043T (AJ011103). Разработанную систему тестировали, используя геномную ДНК, выделенную методом лизиса целых клеток раствором 0,05M NaOH, штаммов бактерий *Halomonas* sp. SMB31 и N6, *Salinicola socius* SMB35T, *Salinicola* sp. BA1, *Chromohalobacter* spp. N1, N3, N5, B201 и B202. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере «My cycler» («Bio-Rad Laboratories», США). Реакционная смесь конечным объемом 25 мкл содержала 5-20 нг ДНК, 0,25 мМ дНТФ, 0,4 мкМ каждого праймера, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1x буфер для HotTaq полимеразы («Силекс», Россия) и 3 ед. акт. HotTaq полимеразы («Силекс», Россия), в смесь отрицательного контроля ДНК не вносили. Процедура амплификации включала начальный денатурирующий шаг при 95°С в течение 15 минут и 30 циклов: 94°С в течение 40 секунд, 57°С в течение 30 секунд, и 72°С в течение 1 минуты 20 секунд; затем следовала терминальная элонгация при 72°С в течение 10 минут. Температура отжига праймеров соответствовала расчетной минимальной температуре плавления. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле в 1x TBE-буфере в напряжении электрического поля 4,5 в/см в течение 1,5 часа. Визуализация геля, окрашенного в растворе бромистого этидия (0,5 мгк/мл), выявила присутствие одного ПЦР-продукта размером около 1288 п.н., соответствующего рассчитанной длине такового *Ch. salexigens* DSM 3043T, у всех тестируемых штаммов. Для подтверждения амплификации нужного фрагмента провели прямое секвенирование ампликонов штаммов, принадлежащих разным родам семейства (*Halomonas* sp. SMB31, *Salinicola socius* SMB35T, Chromohalobacter sp. N1), с помощью разработанных праймеров, Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v 3.1 («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенатор Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США), следуя инструкциям фирмы-производителя. Последующий сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с депонированными в публичных базах *ect*-генами с помощью программы Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) выявил более чем 80% гомологии.

Таким образом, предложенную систему праймеров можно использовать для амплифицикации и секвенирования фрагмента *ect*-оперона у представителей разных родов семейства *Halomonadaceae*.

Работа поддержана грантом Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (номер гос. регистрации 01200963682).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Okamoto T., Maruyama A., Imura S., Takeyama H., Naganuma T.* Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16S rRNA, *gyrB* and *ectBC* gene sequences // Syst. Appl. Microbiol. – 2004. – V. 27(3). – P. 323–333.

2. *Kuhlmann A.U., Bremer E.* Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus spp.* // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68(2). – P. 772–783.

Anan'ina L.N., Plotnikova E.G.

A NEW PRIMER SYSTEM FOR AMPLIFICATION OF *ect*-GENES IN BACTERIA OF *HALOMONADACEAE* FAMILY

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, ludaananyina@mail.ru

Summary. Based on the analysis of known nucleotide sequences of the operon encoding the enzymes of ectoine synthesis, a pair of degenerate primers for amplification and sequencing of the site that contains the fragments of *ect*A and *ect*B genes in the representatives of different genera of *Halomonadaceae* family was developed and optimized.

Key words: halophilic bacteria, *Halomonadaceae*, *ect*-genes, PCR.

УДК 579.252.5

Андрющенко С.В.

ДЕЙСТВИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ МОДИФИКАТОРОВ КОПИЙНОСТИ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК НА АНТИЛИЗОЦИМНУЮ АКТИВНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI*

Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза

Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, rattus000@gmail.com

Резюме. В работе проведено исследование вариабельности числа копий плазмидной ДНК и антилизоцимной активности плазмидосодержащего штамма *Escherichia coli* 252 (ИКВС) под действием препаратов хлорамфеникола и акридинового оранжевого. Показано ингибирующее действие акридинового оранжевого и стимулирующее – хлорамфеникола как на копийность плазмидной ДНК, так и на исследуемый фенотипический признак данного штамма. Полученные данные могут служить косвенным доказательством преимущественно плазмидной локализации генетических детерминант антилизоцимного признака у бактерий и его усиления через механизм дозы генов при действии хлорамфеникола.

Ключевые слова: хлорамфеникол, акридиновый оранжевый, антилизоцимная активность, плазмиды, эффект дозы генов.

Введение

Среди способов культивирования плазмидосодержащих бактериальных клеток как с целью неспецифического увеличения, так и уменьшения удельного числа копий плазмид, в течение более чем 25 лет существуют методы с применением бактериостатических количеств блокатора трансляции хлорамфенкола [1] и субингибиторных концентраций интеркалирующего красителя акридинового оранжевого [2] соответственно. Также накоплены данные о стимулирующем влиянии хлорамфеникола на один из ключевых факторов персистенции бактерий на этапе колонизации – антилизоцимную активность [3].

Эти данные могут служить косвенным доказательством преимущественно плазмидной локализации генетических детерминант антилизоцимного признака у бактерий и его регуляции через механизм дозы генов [4], при условии выраженной корреляции между концентрацией препарата в среде и уровнем исследуемого признака у конкретного плазмидсодержащего штамма.

В связи с чем, целью настоящего исследования явилось определение вариабельности числа копий плазмидной ДНК плазмидосодержащего штамма *Escherichia coli* 252 (ИКВС) под действием препаратов хлорамфеникола и акридинового оранжевого.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужил выделенный из кишечного биотопа человека плазмидосодержащий штамм *E. coli* 252 (ИКВС), отобранный ранее при скрининговом выделении антибиотикорезистентных энтеробактерий по наличию антилизоцимной активности (более 1 мкг/мл*ОП). В качестве контроля использовался бесплазмидный лабораторный штамм *E. coli* К-12. Клетки исследуемых штаммов подвергались воздействию 0,5 и 1-кратной МПК хлорамфеникола по методике неспецифической амплификации плазмидной ДНК по Т. Маниатису с соавт. [1] Акридиновый оранжевый применялся в 0,5 и 1-кратной начальной ингибирующей концентрации по Tomas с соавт. [2] После нормирования получаемых бактериальных культур по оптической плотности, проводилось выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса с последующим электрофорезом в 0,75% агарозном геле с добавлением 50 мкг/мл бромида этидия [1]. Визуализация результатов электрофоретического разделения нуклеиновых кислот проводилась в проходящем УФ-свете с длиной волны 312 нм. Оценка количества молекул плазмидной ДНК осуществлялась путем сравнения интенсивности полос люминесценции опытных проб плазмидной ДНК с использованием программного обеспечения TotalLab 2.01. Определение антилизоцимной активности производилось фотометрическим методом по О.В. Бухарину [3].

Результаты и обсуждение

Исследование вариабельности числа копий плазмид штамма *E. coli* 252 под воздействием акридинового оранжевого показало резкое уменьшение копийности вплоть до полного отсутствия электрофоретически-визуализируемой плазмидной ДНК при достижении начальной ингибирующей концентрации. Инкубирование бактерий в среде с хлорамфеникол, наоборот, приводило к нарастанию интенсивности полос люминесценции выделенной пДНК в 1,5 раза при достижении 1-кратной МПК.

Изучение динамики антилизоцимной активности данного штамма при действии акридинового оранжевого выявило выраженное снижение значений исследуемого признака при достижении 1-кратной ингибирующей концентрации (рис.1). В случае с бактериальными культурами, подвергнутыми воздействию хлорамфеникола в указанных концентрациях, происходило нарастание уровня антилизоцимной активности в 1,5-2 раза (рис.2).

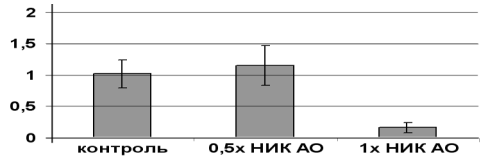


Рис. 1. Уровни антилизоцимной активности *E. coli* 252 под действием акридинового оранжевого

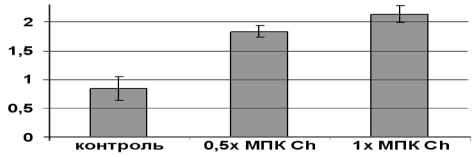


Рис. 2. Уровни антилизоцимной активности *E. coli* 252 под действием хлорамфеникола

Достоверных различий в уровне антилизоцимной активности у клеток контрольного штамма *E. coli* К-12 под воздействием указанных соединений в данных концентрациях по сравнению с интактными клетками не выявлено.

Выявленное в результате проведенных экспериментов изменение антилизоцимной активности, реализующееся параллельно уменьшению либо увеличению удельного числа копий плазмид под воздействием суббактериостатических концентраций акридинового оранжевого либо хлорамфеникола соответственно, позволяет предположить, что данный фенотипический эффект реализуется за счет эффекта «дозы генов», локализованных в плазмиде, инициация репликации которой находится под ослабленным контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж*. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. – 480 с.

2. *Tomas T.J., William W.K.* A simple and rapid method for the elimination of R plasmids from enteric bacteria // Current Microbiology. – 1984. – V. 11. – P. 155-158.

3. *Бухарин О.В.* Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. – 366 с.

4. *Foster T.J.* Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria // Microbiological Rev. – 1983. – V. 47. № 3. – P. 361-409.

Andryuschenko S.V.

ACTION OF NON-SPECIFIC MODIFIERS OF PLASMID DNA COPY NUMBER ON *ESCHERICHIA COLI* ANTI-LYZOZYME ACTIVITY

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS,

Orenburg, Russia, rattus000@gmail.com

Summary. In this study we have investigated the changes in a plasmid DNA copy number and anti-lysozyme activity of plasmid-carrier strain *E. coli* 252 (ICaIS) under the influence of chloramphenicol and acridine orange. Amplification effect of chloramphenicol and inhibition activity of acridine orange was shown both on a plasmid DNA copy number and a phenotype property under study. The data obtained testify in favor of a plasmid localization of anti-lysozyme activity genes and a gene-dose effect as an intensifying mechanism of anti-lysozyme activity of bacteria under the action of chloramphenicol.

Key words: chloramphenicol, acridine orange, anti-lysozyme activity, plasmids, gene-dose effect.

УДК 579.22

Ахова А.В., Ткаченко А.Г.

РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ В АДАПТАЦИИ *ESCHERICHIA COLI* К ДЕЙСТВИЮ ФТОРХИНОЛОНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, Пермь, Россия, akhovan@mail.ru

Резюме. Установлено, что в ответ на добавку фторхинолонов в клетках *Escherichia coli* происходит повышение активности ферментов синтеза полиаминов и накопление путресцина, спермидина и кадаверина. Накопление в клетках полиаминов (как за счет эндогенного синтеза, так и в результате добавки извне) сопровождается снижением их чувствительности к фторхинолонам. Детальное изучение роли полиаминов в приспособлении к действию антибиотиков показало их участие, по меньшей мере, в трех адаптивных механизмах: 1) ограничении проницаемости клеточной стенки, 2) антиоксидантной защите клетки, 3) протекторном действии, направленном на сохранение целостности ДНК.

Ключевые слова: полиамины, антибиотикоустойчивость, фторхинолоны.

Комплексное воздействие неблагоприятных факторов внешней среды на микроорганизмы способствовало формированию у них универсальных механизмов защиты. Функциональные возможности данных систем адаптации могут быть направлены, в частности, на противодействие антибиотикам и, таким образом, способствовать формированию множественной лекарственной устойчивости. В качестве неспецифических адаптогенов, принимающих участие в процессе приспособления разнообразных организмов к неблагоприятным условиям среды, рассматривают полиамины. Биогенные полиамины (путресцин, спермидин, кадаверин) оказывают влияние на устойчивость клеток *Escherichia coli* к окислительному, кислотному, тепловому и другим видам стресса [1, 2]. Защитное действие полиаминов, основанное, в частности, на их антиоксидантных свойствах [2] и способности ингибировать проницаемость клеточной стенки [3] послужило основанием для предположения о возможном участии этих соединений в приспособлении бактериальных клеток к действию антибиотиков. Цель настоящей работы – исследование роли полиаминов в формировании адаптивного ответа *E. coli* на действие фторхинолоновых антибиотиков.

Все исследованные фторхинолоны (налидиксовая кислота, пефлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин), относящиеся к трем различным поколениям, вызывали накопление в клетках *E. coli* путресцина, спермидина и кадаверина. Наблюдаемое изменение концентрации клеточных полиаминов было обусловлено возрастанием активности ферментов их синтеза. В ответ на добавку антибиотиков в бактериальных клетках возрастала активность как орнитиндекарбоксилазы (ключевого фермента синтеза путресцина и спермидина), так и обеих изоформ лизиндекарбоксилазы (CadA и LdcC), катализирующих синтез кадаверина.

Накопление в бактериальных клетках полиаминов (за счет их эндогенного синтеза или в ответ на добавку экзогенных полиаминов в среду культивирования) способствовало снижению чувствительности E. coli к антибиотикам. Положительный эффект эндогенных полиаминов продемонстрирован на клетках, выращенных на средах в отсутствие или с добавкой предшественников полиаминов – лизина или орнитина. Наличие в среде культивирования орнитина приводило почти к трехкратному увеличению внутриклеточной концентрации путресцина, а добавка лизина сопровождалась накоплением эндогенного кадаверина, который не обнаруживался в клетках, выращенных в отсутствие аминокислот. Наличие в клетках кадаверина сопровождалось снижением их чувствительности к левофлоксацину более, чем в 2 раза. Накопление путресцина обеспечивало повышение выживаемости *E. coli*, подвергнутой действию фторхинолона более, чем в 10 раз. Определение минимальных подавляющих концентраций методом двукратных разведений показало, что в присутствии полиаминов в среде происходит снижение чувствительности бактериальных клеток к фторхинолонам, пропорциональное концентрации полиаминов. Обращает на себя внимание то, что максимальный эффект оказывал спермидин, который в концентрации 5 мМ повышал минимальную подавляющую концентрацию левофлоксацина в 4 раза.

Основой бактерицидного действия фторхинолонов является повреждение бактериальной ДНК [4], которое регистрировалось по появлению «шмера» в агарозном геле в процессе электрофоретического разделения ДНК, выделенной из клеток, подвергнутых действию фторхинолонов. Путресцин и спермидин в концентрации 10 мМ полностью снимали повреждающий эффект антибиотика, что выражалось в исчезновении «шмера» на электрофореграмме. В отличие от этого, кадаверин не оказывал выраженного действия на степень повреждения ДНК.

Наблюдаемая фрагментация ДНК является результатом деструктивного эффекта активных форм кислорода, продукция которых значительно возрастала в бактериальных клетках в ответ на воздействие антибиотиков. Добавка полиаминов снижала силу окислительного стресса, вызванного действием антибиотика, что регистрировалось по уменьшению продукции активных форм кислорода и снижению уровня экспрессии генов антиоксидантной защиты *sox*RS-регулона. Путресцин и спермидин оказывали наиболее существенный антиоксидантный и ДНК протекторный эффекты, тогда как кадаверин существенно снижал проницаемость клеточной стенки бактерий для антибиотиков, проявляя выраженную концентрационную зависимость эффекта.

Таким образом, накопление полиаминов обеспечивает снижение чувствительности клеток к фторхинолонам. Показало их участие, по меньшей мере, в трех адаптивных механизмах: 1) антиоксидантной защите клетки, 2) протекторном действии, направленном на сохранение целостности ДНК, 3) ограничении проницаемости клеточной стенки. Путресцин и спермидин в первую очередь участвуют в защите бактериальной клетки от окислительного повреждения, тогда как кадаверин преимущественно играет роль регулятора проницаемости клеточной стенки для антибиотиков.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 11-04-96001) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (номер гос. регистрации 01200963690).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K.* Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // J. Cell Mol. Med. – 2007. – V. 11. N. 4. – P. 685–703.
2. *Tkachenko A., Nesterova L., Pshenichnov M.* The role of natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *E. coli* // Arch. Microbiol. – 2001. – V. 176. – P. 155–157.
3. *delaVega A.L., Delcour A.H.* Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability // J. Bacteriol. –1996. – P. 3715–3721.
4. *Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X.* Quinolone-mediated bacterial death // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – V. 52. N. 2. – P. 385–92.

Akhova A.V., Tkachenko A.G.

POLYAMINES IN *ESCHERICHIA COLI* ADAPTATION TO FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS TREATMENT

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

Perm, Russia, akhovan@mail.ru

Summary. Fluoroquinolones (nalidixic acid, pefloxacin, levofloxacine, ciprofloxacine) impact was shown to induce polyamine-synthesis enzymes activity (ornithine decarboxylase, lysine decarboxylases CadA and LdcC) and accumulation of putrescine, cadaverine and spermidine in E. coli cells. Enrichment of bacterial cells with polyamines led to their fluoroquinolone-susceptibility diminution. It was found, that protective effect of polyamines was based on three kind of activity, at least, 1) antioxidative, 2) DNA protective and 3) cell wall permeability restrictive.

Key words: polyamines, antibiotic resistance, fluoroquinolones.

УДК 579.23; 579.22

Белоногова Н.В., Колпаков А.И., Куриненко Б.М., Маргулис А.Б.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГОМОСЕРИНЛАКТОНА *IN VIVO*

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, anna.margulis@ksu.ru

Резюме. Понимание биологической активности ацилированных лактонов гомосерина (АГЛ) и экологических последствий такой деятельности может дать возможность манипулировать составом и функциями сложных биологических комплексов. Это расширяет биотехнологическую значимость исследований АГЛ для ослабления вирулентности патогенов человека, животных и растений. В работе показано, что обработка культуры стафилококка N-гексаноил-DL-гомосеринлактоном снижает вирулентность стафилококка, что приводит к повышению выживаемости мышей при развитии стафилококковой инфекции.

Ключевые слова: N-гексаноил-DL-гомосеринлактон, *Staphylococcus aureus*, микроядра.

Введение

Известно, что класс соединений ацилированных лактонов гомосерина (АГЛ) проявляет свое действие на различных биологических уровнях организации. В настоящее время показано, что к ацилированным гомосеринлактонам чувствительны также те бактерии, которые сами не способны их синтезировать. В частности, к таким бактериям относится золотистый стафилококк [1]. Золотистый стафилококк часто входит в состав нормальной микрофлоры человека. Носителями стафилококка являются 15-30% клинически здоровых лиц, причем встречается как ограниченное неделями или месяцами носительство, так и хроническое носительство, типичное для персонала медицинских учреждений и некоторых пациентов. Подавляющее число стафилококковых инфекций носит эндогенный характер, связанный с активацией аутомикрофлоры [2]. Этот факт подчеркивает безусловную важность исследований, связанных с возможностью направленной регуляции интенсивности жизнедеятельности такого рода бактерий. Разработка новых терапевтических подходов для лечения стафилококковой инфекции является одной из основных задач, в связи с увеличением числа бактерий, устойчивых к обычным антибактериальным препаратам [3]. Таким образом, нарушение клеточной сигнализации маленькими молекулами антагонистами, которые конкурируют с аутоиндукторами за сайты связывания с рецепторными белками или белками активаторами транскрипции, позволит отключать гены вирулентности и ослаблять возбудителя, что является привлекательной стратегией. Это предположение было подтверждено в исследовании, где блокировались циклические тиолактон-пептид-зависимые плотностно-зависимые системы, которые контролировали вирулентность *Staphylococcus aureus*, что привело к ослаблению инфекции на модели абсцесса мыши. Учитывая важность устойчивого к мецитилину *S. aureus*, который устойчив практически ко всем клинически доступным антибиотикам, включая ванкомицин, это дает реальную возможность для разработки нового анти-стафилококкового лечения [4]. Целью настоящей работы являлось оценить изменения физиологических и биохимических параметров крови мышей при внесении стафилококка, обработанного ацилированным гомосеринлактоном, *in vivo*.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *Staphylococcus aureus ESh1*- клинический изолят, проявляющий гемолитическую активность. Также применяли ацилированный гомосеринлактон (N-гексаноил-DL-гомосеринлактон, М.в.=199,25) производства “BioChemika Fluka” в концентрации 100 нг/мл. Вещество растворяли в диметилсульфоксиде, конечная концентрация растворителя в среде не превышала 3%. Выращивание суточной культуры (24 часа) проводили на L-бульоне при 37°С. Для выявления стафилококка в исследуемых образцах проводили высев на кровяной агар с добавлением 5% суспензии эритроцитов барана. Для эксперимента использовали белых лабораторных мышей массой 21-25 г. Мышей заражали стафилококком, вводя по 0,1 мл культуры стафилококка внутрибрюшинно. Проводили забор крови из хвостовой вены через 6, 24, 48, 72 ч и далее в течение недели или до гибели групп, зараженных стафилококком. Для предотвращения сворачивания крови эппендорфы обрабатывали гепарином. Часть мышей забивали для проведения вскрытия.

Результаты и обсуждение

В результате эксперимента было показано, что процент выживаемости мышей, зараженных необработанным стафилококком, в 2-3 раза ниже процента выживаемости мышей, зараженных стафилококком, прошедшим двухчасовую предобработку ацилированным гомосеринлактоном. Кроме того, обнаружено, что кровь мышей, зараженных стафилококком, обработанным и необработанным ацилированным гомосеринлактоном, обладает генотоксической активностью в микроядерном тесте. Количество микроядер превышает нормальные показатели в 5 раз. Количественных различий для штаммов с обработкой и без нее не обнаружено. При этом время свертываемости крови уменьшается для зараженных стафилококком мышей в 6 раз. Предварительная обработка стафилококка ацилированным гомосеринлактоном приводит увеличению времени свертываемости в 3 раза. Методом масс-спектрометрии установлено, что печень зараженных мышей содержит в 2 раза больше калия, чем печень здоровых мышей. Количественное содержание исследованных катионов для мышей, зараженных культурой стафилококка, обработанной ацилированным гомосеринлактоном, значимо не отличалось от контроля.

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что предварительная обработка стафилококка ацилированным гомосеринлактоном приводит к значительным изменениям его физиолого-биохимических свойств. На базе этих результатов и данных литературы о снижении вирулентности стафилококка при действии АГЛ можно прогнозировать создание и применение терапевтических агентов, содержащих в своем составе ацилированные лактоны гомосерина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК №14.740.11.1040 от 23 мая 2011) и РФФИ (№8470; 09-03-99014 р-офи).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Qazi S. Middleton B., Muharram S.H.*, et al. N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in Staphylococcus aureus // Infect Immun – 2006. – V.74. N.2. – P.910-919.

2. *Покровский В.И., Поздеев О.К.* Медицинская микробиология. – М.: ГЕОТАР Медицина, 1998. – 416 с.

3. *Cegelski L., Marshall G.R., Eldridge G.R.*, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies // Nat Rev Microbiol – 2008. – V.6. N.1 – P.137-149.

4. QS in Staphylococci. 2009 (http://www.nottingham.ac.uk/quorum/index.htm).

Belonogova N.V., Kolpakov A.I., Kurinenko B.M., Margulis A.B.

CHARACTERISTICS OF STAPHYLOCOCCAL INFECTION UNDER HOMOSERINE LACTONE TREATMENT *IN VIVO*

Kazan (Volga region) Federal University,

Kazan, Russia, anna.margulis@ksu.ru

Summary. Understanding the biological activity of acyl- homoserine lactones (AHL) and environmental impacts of these activities may allow us to manipulate the composition and function of complex biological systems. This expands the significance of AHL biotechnology research to reduce the virulence of human, animal and plant pathogens. It is shown that virulence of *Staphylococcus aureus* with N-hexanoyl-DL-homoserine lactone treatment decreases, which leads to increased murine survival under the progression of staphylococcal infection.

Key words: N-hexanoyl-DL-homoserine lactone, *Staphylococcus aureus*, micronuclei.

УДК 579.25

Белоусова Е.В.[1], Тутукина М.Н.[2], Грабович М.Ю.[1]

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ДИССИМИЛЯЦИОННОГО СЕРНОГО МЕТАБОЛИЗМА У *SPHAEROTILUS NATANS* SUBSP. *SULFIDIVORANS*

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Россия, curly_999@mail.ru;

[2] Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия

Резюме. Благодаря использованию методов молекулярной биологии была подтверждена способность представителя рода *Sphaerotilus - Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* к литоторофному росту за счёт окисления тиосульфата, используемого в энергетическом метаболизме. Впервые была получена нуклеотидная последовательность генов *soxB, aprBA, sqr*, анализ которых показал высокий уровень гомологии с аналогичными генами других сероокисляющих бактерий. Кроме того, была показана зависимость экспрессии генов *soxB* и *aprBA* от степени аэрации среды – в микроаэробных условиях культивирования по сравнению с аэробными уровень экспрессии увеличивался в 4 и 7 раз, соответственно. Полученные данные подтверждают результаты биохимических исследований – основным фактором, определяющим тип метаболизма у *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* в присутствии восстановленных соединений серы, является концентрация кислорода.

Ключевые слова: серный метаболизм, литотрофия, экспрессия генов.

На сегодняшний день род *Sphaerotilus* представлен тремя видами: *S. natans, S. montanus и S. hippie*. В составе вида *S. natans* выделено 2 подвида. Гетеротрофные штаммы, включая типовой вид рода, объединены в подвид *S. natans* ssp. *natans*. Штаммы, способные к литотрофному росту с восстановленными соединениями серы и обитающие в сероводородных биотопах составляют подвид *S. natans* ssp. *sulfidivorans*. Для представителей *S. natans* subsp. *sulfidivorans* subsp. nov. ранее была показана способность к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы на биохимическом уровне. Способность к литотрофии индуцируется у большинства штаммов в микроаэробных условиях [1].

В качестве представительных штаммов для анализа генов *soxB*, *aprBA*, *sqr* были использованы физиологически гетерогенные штаммы *S. natans ssp. sulfidivorans* Д-501^{T} и Д-507, характерным отличием которых является способность штамма Д-507 к литотрофному росту независимо от кислородных условий культивирования, в отличие от штамма Д-501^{T}, у которого индукция литотрофного роста происходит только в микроаэробных условиях.

Анализ *soxB* гена. Для обнаружения гена *soxB*, кодирующего гидролазу SoxB из тиосульфатокисляющего комплекса Sox, были использованы вырожденные праймеры, подобранные на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей. Обратная транскрипция с последующим ПЦР-анализом показала наличие экспрессии гена soxB в клетках штаммов S.natans ssp. sulfidivorans Д-501^{T} и Д-507. При использовании праймеров *693F-1164B* был получен фрагмент ожидаемой длины (471 п.н.), последовательность которого была в значительной степени гомологична (60,5-100%) генам *soxB* бактериальных штаммов, ранее депонированным в базу данных NCBI.

Анализ *aprAB* гена. Для детекции гена *aprBA*, кодирующего диссимиляторную аденозин-5'-фосфосульфатредуктазу, были использованы праймеры *AprB1Fw- AprA5RV*, позволяющие амплифицировать гены обеих субъединиц фермента, и праймеры *AprA1Fw-5RV*, позволяющие амплифицировать ген субъединицы А. В результате ОТ-ПЦР анализа были получены продукты длиной 1300 и 400 п.н., соответственно для обоих штаммов. Сравнение полученных ПЦР продуктов с ближайшими последовательностями в базе данных NCBI показало, что эти последовательности имеют высокую степень сходства с последовательностями гена *aprAB* из других организмов (60-100%).Это позволяет нам утверждать, что полученный ПЦР продукт из ДНК анализируемых культур действительно является геном *aprBA*.

Анализ *sqr* гена. Для выявления гена *sqr*, кодирующего сульфидхинон оксидоредуктазу, были использованы праймеры *G3-199F-G3-566R*. В результате амплификации был получен ПЦР-продукт длиной ~310 п.н., что соответствует теоретически ожидаемому. Однако помимо данного продукта присутствовали также и неспецифические продукты амплификации. В связи с этим, экспрессия данного гена в аэробных и микроаэробных условиях в дальнейшем оценена не была. Сравнение секвенированного ПЦР продукта с ближайшими последовательностями в базе данных NCBI показало, что эта последовательность имеет высокую степень сходства с последовательностями генов *sqr* различных сероокисляющих прокариот (60-82%).

Экспрессия генов *soxB* и *aprBA*. Как было показано выше, основным фактором, определяющим тип метаболизма у Д-501^{T} в присутствии восстановленных соединений серы, является концентрация кислорода. В микроаэробных условиях по сравнению с аэробными в значительной степени происходит увеличение скорости окисления восстановленных соединений серы и интенсивности дыхания на тиосульфате. Поэтому для количественной оценки уровня экспрессии генов *soxB* и *aprAB* в микроаэробных и аэробных условиях была проведена ОТ-ПЦР в реальном времени. Для экспериментов были использованы три независимых выделения РНК, при этом с каждой кДНК проводилось по два эксперимента, с двумя концентрациями кДНК в ПЦР-пробе – 2 и 4 мкл. В результате было показано, что в микроаэробных условиях экспрессия гена *soxB* усиливалась в 7.23±1.27 раз, экспрессия гена *aprAB* усиливалась в 3,78±0,64 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гриднева Е.В.* и др. Экофизиология литотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников Северного Кавказа // Микробиология. – 2009. Т. 78. № 1. – С. 89-97.

Belousova E.V.[1], Tutukina M. N.[2], Grabovich M. Ju.[3]

IDENTIFICATION OF THE GENE ENCODING FOR ENZYMES OF DISSIMILATORY SULFUR METABOLISM IN *SPHAEROTILUS NATANS* SUBSP. *SULFIDIVORANS*

[1]Voronezh State University, Voronezh, Russia;

[2]Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Summary. Using methods of molecular biology we have confirmed the ability of *Sphaerotilus* genus representatives *Sphaerotilus natans* subsp. *sulfidivorans* to grow lithotrophically due to thiosulfate oxidation, which is used in energetic metabolism. Nucleotide sequence of *soxB aprBA*, sqr genes fragment were obtained for the first time suggesting its high homology with other sulfur oxidizing bacteria. Furthermore, *soxB* and *aprBA* expression level displayed evident dependence on media aeration – during microaerobic growth the expression levels were 4 and 7-fold higher, respectively, as compared to aerobic cultivation. The data obtained by qRT-PCR are in line with biochemistry assays and support the suggestion that oxygen concentration is the key factor determining metabolic type of *Sphaerotilus* natans subsp. *sulfidivorans* in the presence of reduced sulfur compounds.

Key words: sulfur metabolism, lithotrophic growth, gene expression.

УДК 574.583+282.247.415

Беляева П.Г.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ПЛАНКТОНА КАМСКОГО И ВОТКИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, belyaeva@psu.ru

Резюме. Изучен видовой состав цианобактерий (ЦБ) планктона среднекамских водохранилищ, определены доминирующие виды. Показано, что в летний период ЦБ преобладают по численности. Отмечено увеличение обилия ЦБ к концу лета и от верхних участков водохранилищ к приплотинным.

Ключевые слова: цианобактерии, фитопланктон, водохранилища.

Введение

Нарушение биологического баланса и массовое развитие одного или нескольких фотосинтезирующих организмов в водоеме все более часто вызывает «цветение» воды. Для решения проблемы «цветения» прежде всего требуется точное научное изучение возбудителя этого явления. Цель настоящей работы – исследование видового состава ЦБ и особенностей их развития в планктоне Камского и Воткинского водохранилищ.

Материалы и методы исследования

Отбор проб планктона проводили в ходе летних стационарных рейсов (2008–2009 гг.) по Камскому плесу водохранилища и центральному плесу Воткинского водохранилищ на 14 «стандартных» створах. Всего было собрано и обработано 84 пробы. Пробы отбирали и обрабатывали по стандартной методике. Численность водорослей подсчитывали в камере «Нажотта» объемом 0,01 мл [1]. Идентификацию (*Cyanophyta/Cyanoprocariota/Cyanobacteria*) ЦБ проводили по классическим и современным определителям [2, 3, 4].

Результаты и обсуждение

За период исследования в составе фитопланктона Камского водохранилища было выявлено 290 таксонов рангом ниже рода, относящихся к 8 отделам, 29 порядкам, 58 семействам и 108 родам. ЦБ имели довольно высокую частоту встречаемости в планктоне и были представлены 3 порядками, 10 семействами, 13 родами, 28 таксонами рангом ниже рода. Доминирующим видом на всех участках водохранилища являлся *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs, численность которого могла достигать от 39,5 до 97,8% общей численности фитопланктона ($N_{общ.}$). Значительное развитие получали также виды родов *Microcystis, Anabaena (M. aeruginosa* (Kütz.) Kütz.*, M. pulverea* (Wood.), *M. wesenbergii* Kom.*, Anabaena affinis* Lemm.*, A. flos-aquae* Breb. ex Born et Flah.*, A. spiroides* Kleb.*, A. planctonica* Brunnth.*)* и *Aphanothece clathrata* W. et G.S. West., их численность достигала 3–5 млн. кл./л в июне и до 50–100 млн. кл./л в августе.

В верхнем, речном участке Камского водохранилища ЦБ не получали значительного развития, в июне их вклад в $N_{общ.}$ составлял лишь 1,9–2,3%, в конце лета увеличивался до 14,4–30,0%. В центральном районе водохранилища средняя численность фитопланктона в июне 2008 г. составляла 9,4±0,9 млн. кл/л (50–80% $N_{общ.}$ принадлежало мелкоклеточным ЦБ). Однако в августе в этом районе отмечалось максимальное разнообразие и обилие ЦБ, когда их численность возростала до 100,0±27,3 млн. кл/л. В приплотинном районе водохранилища формировался наиболее продуктивный фитоценоз, в июне доля ЦБ составляла 22,8%, тогда как в августе при их доминировании значительно увеличивались (92,6% $N_{общ.}$).

В Воткинском водохранилище за период исследований было отмечено 256 таксонов водорослей рангом ниже рода. ЦБ были представлены 3 порядками, 11 семействами, 15 родами, 40 таксонами рангом ниже рода и составляли 12% видового разнообразия фитопланктона. Численность и доля ЦБ, также как и в Камском водохранилище увеличивалась по продольной оси от верхнего (17,2% $N_{общ.}$) к приплотинному району (69,4% $N_{общ.}$). Доминирующим видом для всех участков водохранилища являлся *Aph. flos-aquae,* численность которого достигала 59–97% $N_{общ.}$ Массовое развитие получали также *M. aeruginosa, M. pulverea, M. wesenbergii, A. affinis, A. spiroides, A. planctonica.*

Средняя численность ЦБ верхнего района Воткинского водохранилища составляла 1,7±0,6 млн. кл./л, в основном за счет вегетации *Aph. flos-aquae* (до 0,8–1,0 млн. кл/л). В центральном районе водохранилища средняя численность фитопланктона в июле уже составляла 11,2±2,4 млн. кл/л (50–80% $N_{общ.}$ принадлежало мелкоклеточным ЦБ). Численность *Aph. flos-aquae* увеличивалась здесь по сравнению с верхним районом до 2,2–5,6 млн. кл/л. В приплотинном районе водохранилища в июле общая численность фитопланктона достигала 23,1±3,4 млн. кл/л. Однако в отдельные периоды численность ЦБ могла превышать 100 млн. кл/л.

Представители отдела *Cyanoprocariota/Cyanophyta* в среднекамских водохранилищах преобладали по числу клеток в планктоне, однако в формировании биомассы основной вклад вносили диатомовые водоросли, из которых преобладали крупноклеточные колониальные формы *(Aulacosira ambiqua* (Grun.) Sim.*, A. granulate* (Ehr.) Sim.*, A. subarctica (*O. Müll.) Haworth*, и Actinocyclus normanii* (Greg.) Hust. Очевидно, что общая картина развития процессов «цветения» воды в исследованных водохранилищах сводится к конкуренции ЦБ и диатомовых водорослей. При этом численность представителей обеих таксономических групп периодически достигала массового развития.

Состав доминирующих форм ЦБ в Камском и Воткинском водохранилищах не изменялся на протяжении ряда лет [5, 6] и в целом схож с таковым даже в незарегулированной Каме [7]. Изменялся лишь вклад отдельных видов в структуру сообществ. Причем, каким бы ни был разнообразным состав планктонных ЦБ, общую картину «цветения» воды исследованных водохранилищ определяли, чаще всего, от одного до трех видов из родов *Aphanizomenon, Microcystis* и *Anabaena*. Анализ многолетней динамики численности ЦБ показывал, что количественное развитие ЦБ довольно сходно на протяжении ряда лет [5, 6].

Заключение

В целом, обилие ЦБ планктона Камского и Воткинского водохранилищ значительно возрастало в конце лета, особенно в средних и нижних районах. В отдельные периоды развитие ЦБ вызывало «цветение» воды, однако его уровень не превышал умеренного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. – М.: Наука, 1975. – 250 с.

2. *Еленкин А.А.* Синезеленые водоросли СССР. – М.; Л., 1949. – Вып. 2. – 1908 с.

3. *Кондратьева Н.В., Коваленко О.В., Приходькова Л.П.* Определитель пресноводных водорослей Украинской ССР. Вып. 1. Синезеленые водоросли. Cyanophyta. Ч. 1. – Киев: Наук. думка, 1984. – 388 с.

4. *Komarek J., Anagnostidis K.* Cyanoprokariota 1. Teil: Chroococcales // Süsswasserflora von Mitteleuropa / Eds. Ettl H., Gartner G., Heynig H., Mollenhauer D. Jena, Stuttgard, Ltibeck, Ulm; G. – Fischer Verlag., 1999. –Bd. 19/1. – 548 p.

5. *Третьякова С.А., Головачева С.И., Батова Е.М.* Фитопланктон. В кн.: Биология Воткинского водохранилища. – Иркутск. Изд-во Иркут. ун-та, 1988. – С. 26–36.

6. *Третьякова С.А.* Фитопланктон Камских водохранилищ // В кн.: Гидробиологическая характеристика водоемов Урала. – Свердловск: УрО АН СССР, 1989. – С. 58–70.

7. *Таусон А.О.* Водные ресурсы Молотовской области. – Молотов: ОГИЗ, 1947. – 321 с.

Belyaeva P.G.

DEVELOPMENTAL PECULIARITIES OF PLANKTONIC CYANOBACTERIA FROM KAMA AND VOTKINSK RESERVOIRS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, belyaeva@psu.ru

Summary. Species composition of planktonic cyanobacteria from the Middle-Kama reservoirs was examined, and the predominant species were determined. It was demonstrated that cyanobacteria prevailed in summer period. The abundance of cyanobacteria was observed by the end of summer, and a similar tendency was noticed on the way from the upper to the lower parts of the reservoir.

Key words: cyanobacteria, phytoplankton, reservoirs.

УДК 579.61; 579.252.2; 579.252.5

Валышева И.В.[1], Сычёва М.В.[2]

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭНТЕРОКОККОВ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, г. Оренбург, valysheva_irina@mail.ru;

[2]Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный аграрный университет», г. Оренбург, sycheva_maria@mail.ru

Резюме. Определено распространение генов *cyl*-оперона в популяции фекальных энтерококков различных видов, выделенных из организма людей. Получены новые данные о соотношении генов *cylM, cylB* и *cylA*, обеспечивающих посттрансляционную модификацию, транспорт и активацию цитолизина у микроорганизмов рода *Enterococcus*.

Ключевые слова: *Enterococcus*, цитолизин, амплификация, вирулентность, антагонизм.

Введение

Цитолизин, продуцируемый энтерококками, представляет собой протеин, способный разрушать широкий спектр про- и эукариотических клеток (бактериоцин/гемолизин). Данный протеин обладает антагонистической активностью в отношении ряда грамположительных микроорганизмов. Гены, кодирующие синтез цитолизина, впервые были обнаружены у штаммов *Enterococcus faecalis* [1]. Синтез и функционирование цитолизина регулирует ряд генов, входящих в состав *cyl*-оперона (продукт гена *cylM* отвечает за посттрансляционную модификацию цитолизина, *cylA* – активацию, *cylB* – транспорт цитолизина). В случае отсутствия одного из генов может произойти сбой в функционировании пептида [2].

Цитолизин часто продуцируют штаммы энтерококков, выделенные из клинического материала. Так, Y. Ike *et al.* [3] показали, что 60% клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных на территории Японии, обладают цитолитической активностью. В то же время, культуры, выделенные от здоровых людей, реже содержат гены, кодирующие цитолизин (17% штаммов).

Материалы и методы исследования

В исследовании использовано 95 культур энтерококков, выделенных из фекалий людей при обследовании на дисбиоз кишечника.

Наличие генов, кодирующих синтез цитолизина, выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для ПЦР-амплификации использовали известные праймеры [4]. Для постановки ПЦР бактериальные лизаты получали с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» (Литех, Россия). ПЦР проводили с 1 мкл лизата в термоциклере "Терцик" (ДНК технология, Россия) по следующему протоколу: 1 цикл – 92ºС, 3 мин; 5 циклов – 92ºС, 5 с, 59ºС, 5 с, 72ºС, 5 с; 25 циклов – 1 мин при 92ºС, 1 мин при 59ºС, 1 мин при 72ºС; последний цикл включал 20 с при 92ºС, 1 мин – 59ºС и элонгацию в течение 10 мин при 72ºС. Температура отжига праймеров была подобрана экспериментально.

Продукты амплификации генов *cyl*-оперона анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркеров молекулярных масс использовали GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс. Для гена *cylM* размер продукта реакции составлял 742 пары нуклеотидов (п.н.), *cylB* – 843 п.н., *cylA* – 517 п.н.

Результаты и обсуждение

Гены *cyl*-оперона, обеспечивающие посттрансляционную модификацию, активность и транспорт цитолизина (*cylM, cylA* и *cylB*), обнаружены у 12±3,3% культур микроорганизмов рода *Enterococcus*, выделенных от людей. Из них 91±8,7% штаммов составили изоляты *E. faecalis*, 9±8,7% – *E. hirae*. У микроорганизмов вида *E. faecalis* выявлены варианты комплекса генов *cylMBA* (40±15,5% культур), *cylMB* (30±14,5%), *cylM* (20±12,7%). Гены *cylM* и *cylA* в комплексе обнаружены у 10±9,5% *E. faecalis* и штамма *E. hirae*. Сочетание генов *cylBA* у исследованных штаммов энтерококков выявлено не было.

Установлено, что подавляющее большинство культур энтерококков, содержащих гены *cyl*-оперона (82±11,9%), были выделены от людей с дисбиозом кишечника.

В геноме штаммов *E. faecium* и *E. durans* не было выявлено генов *cyl*-оперона.

Среди штаммов энтерококков, выделенных из фекалий людей при обследовании на дисбиоз кишечника, комплекс генов, кодирующих цитолизин, обнаружен у 12% культур, что согласуется с данными зарубежных авторов.

В настоящее время установлено, что гены, кодирующие цитолизин, встречаются у различных видов энтерококков [5]. По данным нашего исследования среди штаммов, содержащих гены *cyl*-оперона, преобладал вид *E. faecalis* (91%). Выявлен 1 штамм (9%) *E. hirae*, имеющий гены *cylA* и *cylM*. Комплекс генов *cylA, cylB* и *cylM*, обеспечивающих более полноценное функционирование цитолизина при межмикробных взаимодействиях, встречался только у 4 штаммов из 11 с *cyl*-положительным генотипом.

Заключение

Таким образом, выявленный у культур *E. faecalis и E. hirae* комплекс генов *cylMBA* позволяет говорить о наличии у данных штаммов эффективного механизма регуляции активности цитолизина – одного из ведущих факторов межмикробного антагонизма энтерококков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dunny G.M., Clewell D.B.* Transmissible toxin (hemolysin) plasmid in Streptococcus faecalis and its mobilization of a noninfectious drug resistance plasmid // J. Bacteriol. – 1975. – V. 124. – P. 784-790.

2. *Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S*. Virulence of enterococci // Clin. Microbiol. Rev. – 1994. – V. 7. – P. 462-478.

3. *Ike Y., Hashimoto H., Clewell D.B.* High incidence of hemolysin production by Enterococcus (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections // J. Clin. Microbiol. – 1987. – V. 25. – P. 1524-1528.

4. *Reviriego C., Eaton T., Martin R.* et al. Screening of virulence determinants in Enterococcus faecium strains isolated from breast milk // J. Hum. Lact. – 2005. – V. 21. – № 2. – P. 131-137.

5. *Semedo T., Santos M.A., Martins P.* et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in Enterococci // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41. – № 6. – P. 2569-2576.

Valysheva I. V.[1], Sycheva M. V.[2]

THE MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF ENTEROCOCCI CYTOLYTIC ACTIVITY

[1]Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis RAS (Ural Branch), Orenburg, valysheva_irina@mail.ru;

[2]The Orenburg State Agrarian University, Orenburg, sycheva_maria@mail.ru

Summary. Distribution of genes of a *cyl*-operon to populations of faecal enterococci from various species being isolated from a human organism is determined. The new data on the correlation of *cylM, cylB* and *cylA* genes providing the posttranslational modification, transport and activation of a cytolysin from microorganisms of genus *Enterococcus* are obtained.

Key words: *Enterococcus*, cytolysin, amplification, virulence, antagonism.

УДК: 579–537.533.35

Васильченко А.С.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РЕАКЦИИ БАКТЕРИЙ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

«Оренбургский государственный университет», г. Оренбург, Россия, avasilchenko@gmail.com

Резюме. В работе рассмотрены вопросы оптимизации методических подходов к исследованию морфологических и механических характеристик бактериальных клеток с использованием атомно-силовой микроскопии. На данной основе охарактеризован принцип контакта углеродных наноматериалов с бактериальными клетками, а также описаны изменения морфофункциональных параметров модельных микроорганизмов при воздействии антибиотиков микробного и животного происхождения.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия (АСМ), углеродные наноматериалы, ампициллин, катионные антимикробные пептиды.

Введение

Методы сканирующей зондовой микроскопии, в том числе атомно-силовая микроскопия (АСМ), являются инновационным прорывом в развитии микроскопической техники. Их важнейшие преимущества – получение изображений с нанометровым пространственным разрешением, а также возможность прямого воздействия на объекты исследования.

Цель настоящей работы – поиск оптимальных подходов к использованию АСМ для исследования морфофункциональных реакций бактериальных клеток, а также их реализация при оценке воздействия углеродных наноматериалов и антибиотиков.

Материалы и методы

Исследования проводили с помощью атомно-силового микроскопа SMM-2000 (“ПРОТОН-МИЭТ”, Россия) с использованием стандартных кантилеверов для контактной моды MSCT-AUNM (“Park Scientific”, США).

Результаты и обсуждения

На первом этапе работы были определены методические подходы к исследованию модельных грамотрицательных (рис. 1А) и грамположительных (рис. 1Б) микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии. Полученные результаты включали обоснование контроля относительной влажности исследуемых образцов, способной оказать существенное влияние на измеряемые морфологические и механические характеристики бактериальных клеток, что было более значимо для *Escherichia coli* K12 по сравнению с *Bacillus cereus* IP 5832, не требующего четкой стандартизации данного параметра пробоподготовки. С другой стороны, обосновано использование полимерных пленок агарозы определенного диапазона концентраций и контролируемой относительной влажности в качестве референс-материала при подготовке атомно-силового микроскопа к последующему исследованию упруго-механических свойств бактериальных клеток. С соблюдением указанных условий на следующем этапе исследований метод АСМ был использован для определения характера и последствий взаимодействия бактериальных клеток с углеродными наноматериалами, а также антибиотиками микробного (ампициллин) и животного (катионные антимикробные пептиды) происхождения (см. рис. 1).

С использованием АСМ визуализирован характер контакта бактериальных клеток с широким спектром углеродных наноматериалов, представленных одно- и многостенными нанотрубками, нановолокнами и С60-фуллеренами, в том числе функционализированных различными химическими группировками (аддендами). Показано, что при контакте с бактериальной поверхностью нанотрубки и нановолокна не имеют однозначной ориентации и не ведут к излитию внутриклеточного содержимого (рис. 1В, Г), что регистрируется только в случае присутствия в их составе значительных количеств металлических технологических примесей. Одновременно установлено, что модификация С60-фуллеренов катионоидными, но не анионоидными аддендами существенно повышает степень их сродства к бактериальной поверхности, предположительно определяемого электростатическим взаимодействием между ними.

При исследовании морфофункциональной реакции бактериальных клеток на воздействие антибиотика ампициллина выявлена выраженная популяционная гетерогенность регистрируемых изменений. При этом наиболее общим моментом являлось увеличение размера клеток, потенциально определяемое действием внутреннего осмотического давления на снизившую свою прочность клеточную стенку. Помимо этого в популяции *E. coli* K 12 обнаружены аномально удлиненные клетки с признаками нарушения септирования (рис. 1Д), а также происходящие от них структуры, утратившие жидкую фракцию цитоплазматического содержимого. В свою очередь, у *B. cereus* IP 5832 действие внутреннего осмотического давления преимущественно вело к увеличению поперечного сечения клетки, изменяя ее форму от палочки к сфере (рис. 1Е), что сопровождалось выраженным нарушением структурированности поверхности с освобождением фрагментов пептидогликана в окружающую среду, а также изменением упруго-механических свойств бактериальной поверхности.

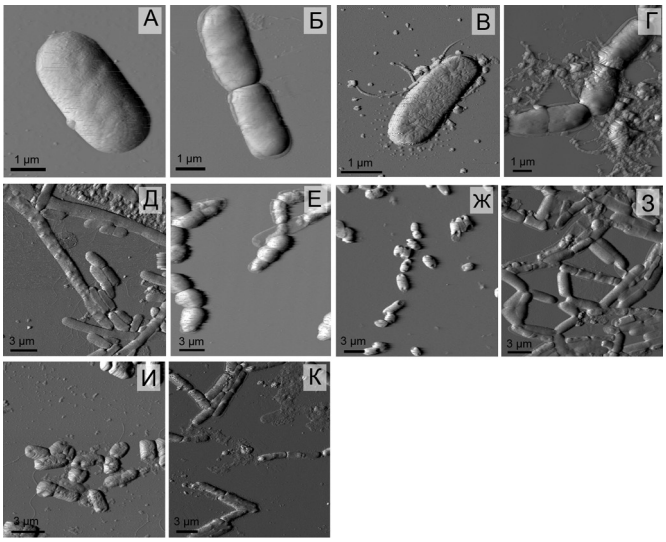


Рис. 1. АСМ-изображения интактных клеток *E. coli* K12 (А) и B. cereus IP 5832 (Б), а также результатов их контакта с одностенными углеродными нанотрубками (В, Г), ампициллином (Д, Е), магаинином 2 (Ж, З) и экстрактом тромбоцитов человека (И, К).

Использование АСМ для сравнительного изучения последствий воздействия экстракта тромбоцитов человека и магаинина 2 на бактериальные клетки позволило констатировать существенное сходство механизмов биологической активности данных катионных антимикробных пептидов. При этом основным результатом явилось формирование поровых комплексов на наружной мембране *E. coli*, а также коллапс их апикальных участков (рис. 1Ж, И). В свою очередь, визуализация подвергнутых подобному воздействию *B. cereus* позволила выявить значительное количество утративших свою ригидность бактериальных клеток в отсутствие видимых повреждений, визуализируемых с использованием АСМ.0 поверхностных структур (рис. 1З, К).

Полученные результаты характеризуют АСМ как информативный метод исследования морфофункциональных характеристик микроорганизмов, позволяя рекомендовать его широкое применение при проведении микробиологических исследований.

Vasilchenko A.S.

USING OF SCANNING PROBE MICROSCOPY TO EVALUATE THE MORPHOFUNCTIONAL RESPONSE OF BACTERIAL CELLS TO VARIOUS IMPACTS

Orenburg State University, Orenburg, Russia, avasilchenko@gmail.com

Summary. The aim of this article was to study the morpho-functional response of model gram-positive and gram-negative bacterial cells to various factors, such as relative humidity, carbon-based nanomaterials, and antibiotics by atomic force microscopy.

Keywords: atomic force microscopy, carbon-based nanomaterials, antibiotics, ampicillin, antimicrobial cationic peptides.

УДК 577.152.1:579.08

Ву Тхи Лоан, Селиванова Н.В., Епринцев А.Т.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ У *SPHAEROTILUS NATANS* Д-507 ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ПИТАНИЯ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», Россия, г. Воронеж, bc366@bio.vsu.ru

Резюме: Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) участвует в цикле Кребса и одновременно является составным компонентом дыхательной цепи, как у эукариот, так и у прокариот. Показано, что в условиях литотрофного роста *Sphaerotilus natans* Д-507 активности СДГ не наблюдалось (вероятно, при литотрофном типе питания исследуемого штамма сукцинат не образуется), тогда как из микроорганизмов, культивируемых органотрофно, получены ферментные препараты двух изоформ СДГ с удельной активностью 22,00 Е/мг белка и 14,75 Е/мг белка. Значение Km для первой и второй изоформ составило 3,85 мМ и 2,08 мМ, соответственно, а оптимальное значение pH – 7,2.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, *Sphaerotilus natans*, изоформа.

Введение

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) участвует в цикле Кребса, катализируя реакцию окисления сукцината, и одновременно является составным компонентом дыхательной цепи передачи электрона, как у эукариот, так и у прокариот. Активность СДГ обнаруживается практически во всех исследованных организмах, при этом некоторые анаэробные прокариоты содержат множественные гены, кодирующие комплекс II [2].

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали матообразующие бактерии рода *Sphaerotilus natans* Д-507, выращенные в разных условиях питания – органотрофном (с добавлением пептона) и литотрофном (с тиосульфатом и лактатом). Активность СДГ определяли спектрофотометрически на СФ-2000 (ЛОМО, Россия) с использованием искусственных акцепторов электронов с подходящим редокс-потенциалом [1]. Очистку фермента осуществляли с использованием пятистадийной схемы при 0-4°С. Кинетические и регуляторные свойства СДГ изучали на электрофоретически гомогенных препаратах СДГ. Константу Михаэлиса рассчитывали методом двойных обратных координат (1/V и 1/[S]) по графику Лайнувера-Берка с применением программ линейной аппроксимации по методу наименьших квадратов.

Результаты исследования и обсуждение

Ранее было показано, что в зависимости от типа питания у бактерий *Sphaerotilus natans* Д-507 обнаруживаются разные формы малатдегидрогеназы (димерная форма МДГ – при органотрофном росте, а тетрамерная – при миксотрофном). Поэтому целью нашей работы было изучения функционирования СДГ у *Sphaerotilus natans* при разных типах питания.

Интересно, что в условиях литотрофного роста активности СДГ не наблюдалось, тогда как в микроорганизмах, культивируемых органотрофно, СДГ активно функционировала. Данный факт, вероятно, можно объяснить тем, что при литотрофном типе питания исследуемого штамма сукцинат не образуется. В связи с этим, дальнейшие исследования проводились на бактериях *Sphaerotilus natans* Д-507, выращенных органотрофно.

Были получены ферментные препараты двух изоформ СДГ с удельной активностью 22,00 Е/мг белка и 14,75 Е/мг белка (таблица).

При изучении каталитических свойств изоферментов СДГ показано, что кинетика реакций подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментена. Значение Km для первой и второй изоформ составило 3,85 мМ и 2,08 мМ соответственно. Полученные результаты позволяют заключить, что выделенные и очищенные до гомогенного состояния формы СДГ обладают различным сродством к субстрату, а именно, $СДГ_1$ обладает меньшим сродством к сукцинату, чем $СДГ_2$. Аналогичные исследования СДГ из других микроорганизмов показали, что у данных объектов исследуемый фермент имеет невысокое сродство к сукцинату, так величина Km СДГ из *Sulfolobus acidocaldarius* составляет 1,420 мМ [4], из *Mycobacterium phlei* – 0,120 мМ и из *Rhodothermus marinus* – 0,165 мМ [3].

Вторым важным фактором, влияющим на активность ферментов, является влияние концентрации ионов водорода. Установлено, что зависимость активности СДГ от концентрации ионов водорода имеет колоколообразный характер. При этом оптимальное значение pH, при котором наблюдалась максимальная активность фермента, для изоформ $СДГ_1$ и $СДГ_2$ находится в пределе, близком к нейтральной среде – 7,2, т.е. совпадает с физиологическим значением pH живой клетки.

Заключение

Таким образом, было установлено, что у бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans* Д-507, культивируемых органотрофно, присутствуют две формы СДГ, тогда как в условиях литотрофного роста исследуемый фермент не функционирует.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Землянухин А.А., Землянухин Л.А.* Большой практикум по физиологии и биохимии растений // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. – 1996. – 185 с.

2. *Brian A. Crowe* and *Peter Owen*. Molecular Properties of Succinate Dehydrogenase Isolated from *Micrococcus luteus* // Journal of Bacteriology. – 1983. – P. 1493-1501.

3. *Fernandes A.S., Pereira M.M., Teixeira M*. The succinate dehydrogenase from the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: Redox-bohr effect on Heme b[L] // J. Bioenerg. and Biomembr. – 2001. – V. 33. № 4. – P. 343-352.

4. *Moll R., Schafer G.* Purification and characterisation of an archaebacterial succinate dehydrogenase complex from the plasma membrane of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius* // Eur. J. of Biochem. – 1991. – V. 201. № 3. – P. 593-600.

Vu Thi Loan, Selivanova N.V., Eprintsev A.T.

PECULIARITIES OF FUNCTIONING OF SUCCINATE DEHYDROGENASE FROM *SPHAEROTILUS NATANS* D-507 AT DIFFERENT TYPES OF NUTRICIENT

Voronezh State University, Russia, Voronezh, bc366@bio.vsu.ru

Summary. Succinate dehydrogenase (SDH, EC 1.3.99.1) is involved in the Krebs cycle, and is also an integral component of the respiratory chain, as in eukaryotes and prokaryotes. It is shown that under conditions of lithotrophic growth activity of SDH wasn't observed (probably succinate isn't formed with the lithotrophic type of nutricient of investigated strain), whereas in bacteria cultured organotrophic, two isoforms of enzymes received with specific activity of SDH 22 E/mg protein and 14,75 E/mg protein. Km value for the first and second izoforms was 3,85 mM and 2,08 mM, respectively, and the optimum pH – 7,2.

Key words: succinate dehydrogenase, *Sphaerotilus natans*, izoform.

Таблица

Очистка сукцинатдегидрогеназы из бактерий (n=3, p<0,05)

Стадия очистки		Объём, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат		4,0	5,67	21,36	0,27	100,00	1,00
Супернатант		3,4	0,24	14,60	0,02	4,23	0,07
Фракционирование сульфатом аммония		3,5	5,01	10,80	0,46	88,36	1,70
Гель-фильтрация на сефадексе G-25		2,0	1,26	1,47	0,86	22,22	3,19
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	2,0	0,88	0,04	22,00	15,52	81,48
	2	2,0	0,59	0,04	14,75	10,41	54,63

УДК 579.61, 615.281.9

Гимадеева Р.М., Бабынин Э.В., Маргулис А.Б.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУРАНОНА

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, frau.gimadeeva@yandex.ru

Резюме. Новые хлорсодержащие фураноны тестировали на наличие антибактериальной активности, а также генотоксичности с помощью теста Эймса. Было установлено, что тестируемые соединения обладают бактерицидными свойствами, причем антибактериальная активность всех четырех соединений отличается в полноценной и минимально-глюкозной средах. Если в полноценном бульоне минимальная ингибирующая концентрация (МИК) веществ варьировала от 150 мкг/мл до 600 мкг/мл, то в глюкозо-солевом растворе активность соединений возрастала в 80-400 раз. Оценка генотоксичности тестируемых соединений выявила слабую мутагенную активность у двух соединений. Другие соединения не проявили никакой мутагенной активности. Роль структуры фуранонов в генотоксичности обсуждается.

Ключевые слова: антибиотики, фуранон, генотоксичность, *Salmonella typhimurium*.

Появление и развитие устойчивости к антибиотикам у бактерий продолжает опережать открытие и внедрение новых антибактериальных препаратов [1]. Создание и развитие более эффективных подходов к защите от инфекций составляют важную область современных научных исследований. Среди соединений, которые могут быть использованы для противоинфекционной терапии, особое место занимают фураноны. Галогенизированные фураноны, например, синтезирует австралийская красная водоросль *Delisea pulchra*, что придает этому растению антибактериальные свойства, препятствующие образованию биопленок на её поверхности [2]. Поскольку для некоторых производных фуранона было показано наличие мутагенных свойств [3], то, прежде чем использовать фураноны как потенциальные антибактериальные препараты, необходимо установить отсутствие возможных мутагенных свойств.

Целью данной работы было оценка антибактериальной активности и генотоксичности новых производных фуранона на примере штамма BA13 *Salmonella typhimurium* (тест Эймса). Производные фуранона синтезированы Курбангалиевой А. Р. (кафедра органической химии, Химический институт им. А.М.Бутлерова, Казанский федеральный университет) (рис.1).

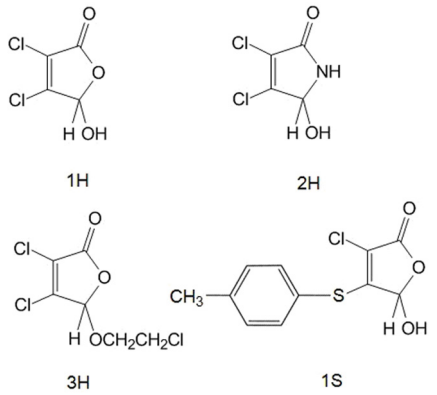


Рис.1. Структурные формулы тестируемых фуранонов: 5-гидрокси-3,4-дихлор-2(5H)-фуранон (мукохлорная кислота) (обозначено как 1H); 5-гидрокси-3,4-дихлор-3-пирролин-2-он (обозначено как 2H); 3,4-дихлор-5-(2-хлорэтокси)-2(5H)-фуранон (обозначено как 3H); 5-гидрокси-4[(4-Метилфенил)тио]-3-хлор-2(5H)-фуранон (обозначено как1S).

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) тестируемых соединений определяли методом серийных разведений в жидких средах. Было установлено, что все тестируемые соединения обладали бактерицидными свойствами, причем антибактериальная активность этих соединений отличалась в полноценной и минимально-глюкозной средах. Наибольшая цитотоксичность была выявлена у фуранона 1H, МИК которого составила 150 мкг/мл на полноценной среде и 0,75мкг/мл на минимальной глюкозной среде. А наименьшей цитотоксичностью обладает фуранон 3H, МИК которого составила 600мкг/мл на полноценной среде и 0,75 мкг/мл на минимальной глюкозной среде.

Различие в антибактериальной активности на этих двух типах сред может быть связано с тем, что фураноны инактивируют рибонуклеотидредуктазу – фермент, катализирующий синтез дезоксирибонуклеотидов [4]. Ингибирование синтеза ДНК на минимальной среде, где клетке необходимо синтезировать все необходимые соединения самой, может определять более сильное бактерицидное воздействие галогенсодержащих фуранонов на бактериальные клетки.

Оценка возможных генотоксических эффектов новых производных фуранона показала наличие слабой мутагенной активности (не более двухкратного превышения) у веществ 1H и 3H (рис. 2). Эти соединения очень сходны по своей структуре и отличаются только модификацией лактонного цикла в третьем положении.

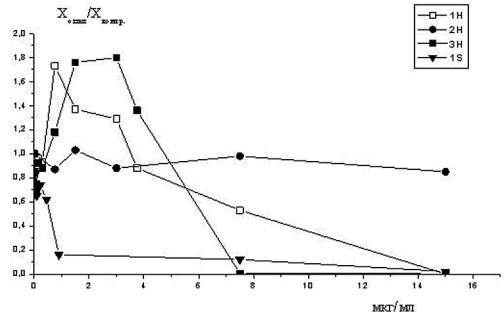


Рис. 2. Оценка генотоксичности производных фуранона в тесте Эймса.

Соединения 2H и 1S не оказывали никакого эффекта на частоту мутаций у *S. typhimurium*. Поскольку соединение 2H характеризуется заменой кислорода в первом положении на азот, а 1S – введением в третье положение лактонного цикла серосодержащей группы, мы можем предположить, что эти молекулярные группы важны для развития генотоксического эффекта фуранонов.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственный контракт N 14.740.11.1040).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Walsh C. T.* Antibiotics: actions, origins, and resistance. – Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003. – 345 p.

2. *Hentzer M., Givskov M.* Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections // J. Clin. Invest. – 2003. – V. 112. – P. 1300-1307.

3. *Ishiguro Y., Santodonato J., Neal M.W.* Mutagenic potency of chlorofuranones and related compounds in *Salmonella* // Environ. Mol. Mutagen. – 1988. – V. 11. – P. 225-234.

4. *Cerqueira N.M.F.S.A., Fernandes P.A., Ramos M.J.* Enzyme ribonucleotide reductase: unraveling an enigmatic paradigm of enzyme inhibition by furanone derivatives // J. Phys. Chem. B. – 2006. – V. 110. – P. 21272–21281.

Gimadeeva R.M., Babynin E.V., Margulis A.B.

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF NEW FURANONE DERIVATIVES

Kazan (Volga Region) Federal University,

Kazan, Russia, frau.gimadeeva@yandex.ru

Summary. New chlorine-containing furanones were tested for presence of antibacterial activity, and also genotoxicity in Ames test. It was established that tested compounds possessed bactericidal properties. Antibacterial activity of all four compounds differed in rich broth and minimal glucose media. If in rich broth minimum inhibitory concentration (MIC) of compounds varied from 150 mkg/ml to 600 mkg/ml, then in a minimal glucose solution the activity of compounds increased by 80-400-fold. The estimation of genotoxicity of tested compounds has revealed weak mutagen activity of two compounds. Other compounds did not show any mutagenic activity. The role of furanone structure in genotoxicity is discussed.

Key words: antibiotic, furanone, genotoxicity, *Salmonella typhimurium*.

УДК 575.224.4

Голясная Н.В., Магданова Л.А., Цветкова Н.А., Гузачева И.М.

МУТАГЕНЕЗ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ РОСТА В *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* «SMALL VARIANT COLONY»

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, goljasnaja@mail.ru

Резюме. Продолжительный стресс, вызванный высокими концентрациями гипохлорита натрия, стимулирует скорость роста, экспорт фукозы в среду и биопленкообразующую активность клеток *Pseudomonas aeruginosa*, образующих на агаризованной среде небольшие гладкие слизистые колонии. Мутагенез стационарной фазы возникает при блокировании рифампицином транскрипции и репликации в клетках. Ингибирование ДНК-гиразы вызывает гибель клеток.

Ключевые слова: мутагенез стационарной фазы роста.

Биопленкообразующие штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, которые обычно вызывают нозокомиальные инфекционные заболевания легких, кожи и урогенитальной системы, отличаются по фенотипическим признакам устойчивости к биоцидам и антибиотикам. Ранее при исследовании резидентной микрофлоры гидротехнического комплекса выделены изоляты *P. aeruginosa*, которые на агаризованной среде образуют нетипичные гладкие малые колонии («small colony variant», далее SCV) стабильные при пересевах [1]. Клетки SCV имеют $(8{,}3\pm5{,}0)\times10^{-9}$ частоту образования Rif+ мутантов на полноценной питательной среде с 300 мкг/мл рифампицина. Биопленкообразующая активность *P. aeruginosa* SCV значительно ниже, а чувствительность к ципрофлоксацину и рифампицину выше, чем клеток, образующих колонии других морфотипов. Высокая чувствительность к антибиотикам сопровождается высокой устойчивостью к гипохлориту натрия, которая обеспечивает выживание клеток SCV в среде с констинуально-дескриптивным характером изменения содержания активных свободных радикалов. Молекулярно-генетические исследования показали, что геном *P. aeruginosa* SCV является «предковым» для субпопуляции клеток, которые чувствительны к пероксиду водорода, имеют среднюю интенсивность мутагенеза стационарной фазы роста, высокую биопленкообразующую активность, а также к клеткам частично ревертировавших к фенотипу дикого вида, но с дефектами в генах *mutS* и *mutL*. Цель настоящей работы – определить влияние гипохлорита натрия на биопленкообразующую активность, синтез фукозы и частоту адаптивных мутантов в культуре клеток *Pseudomonas aeruginosa* SCV.

Выявленное в работе дозо-зависимое увеличение скорости роста клеток в инкубационной LB среде, а также в M9 с добавлением в качестве единственных источников углерода 2% глюкозы или 0,5% глицерина и гипохлорита натрия в конечных концентрациях от от 0,3 до 2,0 мг/л обусловлено биохимической трансформацией хлорита в хлорид и молекулярный кислород [2, 3]. Максимальный стимулирующий эффект высоких концентраций биоцида на биопленкообразование, синтез фукозы определен в клетках, культивируемых в течение 48 ч в M9 с глицерином, а минимальный – в LB среде. Обработка в течение 18 ч высокими концентрациями гипохлорита натрия активируют подвижность «роения» (swarming motility) клеток и в два раза сокращает период существования клеток в составе пленки. Стадия дисперсии, т.е. разрушение пленки и переход клеток в стадию планктонной культуры происходит раньше, если клетки культивировали в M9 с глицерином, в отличие от клеток культивируемых в жидкой LB среде.

На агаризованной LB среде клетки, обработанные гипохлоритом натрия, образуют слизистую биопленку в течение 24 ч инкубации, а на LB среде с рифампцином видимые колонии, не вырабатывающие слизь, формируются только через 48 ч. Крупные колонии с морфотипом дикого типа появляются с частотой 10^{-3} среди колоний SCV, выросших на агаре с рифампицином. Адаптивные мутанты не образуются на среде с ципрофлоксацином, ингибитором ДНК-гиразы, который использовали в качестве стрессорного фактора, стимулирующего адаптивный мутагенез.

Сопоставление полученных результатов с данными Gomes-Gomes [4] и McKenzie [5] позволило предположить, что такие оксиданты, как гипохлорит натрия, активируют RecA-зависимую подвижность «роения». Устойчивость клеток к рифампицину, возникающая после воздействия гипохлорита натрия, может быть обусловлена *mfd*-мутагенезом стационарной фазы роста. Впервые участие в мутагенезе стационарной фазе роста продукта гена *mfd* установлено в работе Ross [6] с *Bacillus subtilis*. Функционирование гена *mfd* происходит при активации RecA белка в клетке. Белок Mfd участвует в эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией, в рекомбинации и является участником периферических процессов, которые влияют на катаболитную репрессию. Возможно, участие белка Mfd в мутагенезе опосредовано через процессы транскрипции и репликации, которые блокируются рифампицином. Потенциально мутационная роль Mfd заключается в образовании точковых мутаций в активно транскрибируемых участках ДНК, нуклеотидная последовательность которых чувствительна к дезаминированию или содержит сайты с лабильной конформационной структурой. Поскольку, как участник репарации ДНК, белок Mfd менее чувствителен к 8-оксогуанину в ДНК, чем к аддуктам алкилирования оснований, продукты окисления остаются нерепарированными потенциально мутагенными повреждениями. Мутагенез стационарной фазы роста, опосредованный белком Mfd, наиболее интенсивно происходит в клетках с инактивированными генами *mutS, mutL*. Интенсивная транскрипция *mutS* и *mutL* в постреплликативный период может быть причиной *mfd*-зависимых мутационных изменений последовательности нуклеотидов в различных участках генов, которые формируют разную по интенсивности мутаторную активность белков MutS и MutL.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Magdanova L.* Mutability of polyspecies bacterial biofilm community members // Biofilms IV International conference, Winchester, UK. – September 2010. – P. 20.
2. *Bender K.S.* Metabolic primers for detection of (per)chlorate-reducing bacteria in the environment and phylogenetic analysis of cld gene sequences // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 5651–5658.
3. *Lalucat J.* Biology of Pseudomonas stutzeri // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2006. – V. 70(2). – P. 510–547.
4. *Gomes-Gomes J.-M.* A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12 // BMC Biology. – 2007. 5:14 doi:10.1186/1741-7007-5-14.
5. *McKenzie G.* The SOS response regulates adaptive mutation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97(12). – P. 6646-6651.
6. *Ross C.* Novel role of mfd: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188(21). – P. 7512–7520.

Goljasnaja N.V., Magdanova L.A., Tsvetkova N.A., Guzacheva I.M.

MUTAGENESIS OF THE STATIONARY GROWTH PHASE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* «SMALL VARIANT COLONY»

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

UB RAS, Perm, Russia, goljasnaja@mail.ru

Summary. Stress induced by high concentrations of sodium hypochlorite stimulates the growth rate, fucose export to the medium and a biofilm-forming activity of Pseudomonas aeruginosa cells which form small smooth mucous colonies on agar surface. Mutagenesis of the stationary growth phase occurs at the arrest of transcription and DNA replication with rifampicin, while inhibition of DNA gyrase leads to cells death.

Key word: mutagenesis of the stationary growth phase.

УДК 547.53:574.24:535.374

Грязева И.В., Давыдова О.К., Кузнецова Н.В.

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ НА СТРЕССОВЫЙ ОТВЕТ АКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ОЦЕНЕННЫЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Оренбургский государственный университет», г. Оренбург, Россия, gryazevai@mail.ru

Резюме. Исследовано влияние пяти гомологов бактериальных ауторегуляторных молекул из группы алкилоксибензолов (АОБ) на стрессовый ответ бактериальных клеток, оцененный на основе люминесцентного отклика клонированных в них генетических конструкций: *recA′::lux* при УФ-облучении и *ibpA′::lux* при температурном воздействии. Показана универсальность эффектов АОБ на стрессовые реакции клеток, заключающихся в ингибировании экспрессии стрессовых регулонов и зависящих от структуры (длины алкильного радикала) и концентрации использованных гомологов АОБ.

Ключевые слова: алкилоксибензолы, *Escherichia coli*, SOS-система, белки теплового шока, биолюминесценция.

Ауторегуляторные d1-факторы, представленные у ряда бактерий и дрожжей алкилоксибензолами (АОБ) и контролирующие их переход в гипометаболическое и анабиотическое состояние, являются предметом большого круга междисциплинарных исследований [1]. Данные соединения, обладая амфифильными свойствами, антиоксидантной активностью и способностью к неспецифическим физико-химическим взаимодействиям с различными биополимерами, обуславливают приобретение воспринимающими их клеточными структурами и клетками в целом повышенной устойчивости к широкому спектру экстремальных воздействий [2-4]. Связанной с этим механизмом биологической активности также является способность некоторых гомологов АОБ индуцировать экспрессию стрессовых генов при сублетальных стрессовых воздействиях [5]. Представленная работа является продолжением исследований в данном направлении, позволяющим по-новому взглянуть на роль АОБ в позитивной и негативной регуляции стрессовых генов при воздействии различных стрессовых факторов.

Целью данного исследования явилось изучение эффектов пяти структурно различающихся гомологов АОБ на формирование стрессового ответа бактериальных клеток при экстремальных физических воздействиях – УФ-облучении и тепловом шоке. В свою очередь методической особенностью работы явилось использование особых генно-инженерных люминесцирующих конструкций *recA′::lux* и *ibpA′::lux*, позволяющих в режиме реального времени получать информацию об уровне транскрипции/трансляции находящихся под контролем данных промоторов стрессовых генов [6].

Исследование собственных эффектов АОБ в отношении *E.coli recA′::lux* и *E.coli ibpA′::lux* позволило констатировать стандартность регистрируемых эффектов, заключающихся в снижении абсолютных значений биолюминесценции, а также уменьшении оцениваемого количеством колониеобразующих единиц числа клеток с сохраненной способностью к росту. Подобные сонаправленные эффекты характеризовалась зависимостью от особенностей химического строения использованных гомологов, будучи в наибольшей степени значимыми при использовании длинноцепочечных АОБ с выраженной ростингибирующей активностью [4]. В свою очередь расчет на данной основе фактора индукции биолюминесценции (Fi), соотносящего интенсивность свечения с количеством функционально активных бактериальных клеток, позволил выявить зависимость экспрессии стрессовых регулонов от концентрации АОБ. При этом низкие концентрации АОБ обуславливали умеренно выраженный рост номинальных значений Fi, что подтверждает представления о данных регуляторных молекулах как своеобразных «алармонах» – сигналах «бактериальной тревоги» [5]. В свою очередь повышение действующих концентраций АОБ вело к выраженному снижению значений Fi, что может объясняться обусловленным воздействием данных факторов и характерным для анабиотических клеток неспецифическим подавлением процессов транскипции/трансляции [2].

На этом фоне регистрация исследуемых параметров при воздействии на клетки, предварительно инкубированные с различными гомологами АОБ, физических факторов (УФ-излучения в отношении *E.coli recA′::lux* и высоких температур в отношении *E.coli ibpA′::lux*) также свидетельствовала о существенном изменении характера формируемой стрессовой реакции. Так, в условиях интенсивного УФ-облучения предварительная обработка АОБ существенно снижала оцениваемый по реакции *recA′::lux* уровень активации SOS-системы, одновременно обуславливая статистически значимое количество бактериальных клеток, сохранивших свою ростовую способность после подобного воздействия. В свою очередь характер индукции *ibpA′::lux* в условиях теплового шока также свидетельствовал об относительном снижении уровня синтеза белков-шаперонов в клетках, предварительно инкубированных в контакте с длинноцепочечными АОБ.

Совокупность полученных результатов позволяет предполагать существование особого универсального эффекта алкилоксибензолов на экспрессию стрессовых генов и регулонов, заключающегося в неспецифической репрессии контролируемых ими «активных» механизмов защиты биополимеров с одновременным обеспечением «пассивной» резистентности таковых к экстремальным факторам среды обитания как результата их модификации АОБ.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (контракт № П327).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М.* и др. Механизмы выживания бактерий – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
2. *Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Степаненко И.Ю.* Изменение физико-химических свойств белков, модифицированных алкилоксибензолами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. №2. – С. 159-167.
3. *Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н.* и др. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза // Микробиология. – 2005. – Т. 74. №5. – С. 616-625.
4. *Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю.* и др. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология. – 2006. – Т. 75. №4. – С. 489-496.
5. *Голод Н.А., Лойко Н.Г., Лобанов К.В.* и др. Роль микробных ауторегуляторов – алкилоксибензолов в контроле экспрессии стрессовых регулонов // Микробиология. – 2009. – Т. 78. №6. – С. 731-741.
6. *Дерябин Д.Г.* Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Наука, 2009. – 246 с.

Gryazeva I.V., Davydova O.K., Kuznetsova N.V.

INFLUENCE OF ALKYLHYDROXYBENZENES ON THE STRESS RESPONSE OF BACTERIAL CELLSESTIMATED USING LUMINESCENT TEST-SYSTEMS

The Orenburg State University,

Orenburg, Russia, gryazevai@mail.ru

Summary. The influence of five homologs of bacterial autoregulatory molecules from the group of alkylhydroxybenzenes (AHB) on stress response of bacterial cells was investigated. Response was assessed by luminescent response of cloned genetic constructs: *recA ′:: lux* under the UV irradiation and *ibpA′:: lux* under the temperature effect. It was shown that the universality of AHB effects on cellular stress response consisted in inhibition of stress regulon expression and depended on the structure (length of the alkyl radical) and the concentration of AHB homologs used.

Key words: alkylhydroxybenzenes, *Escherichia coli*, SOS-system, heat shock proteins bioluminescence.

УДК 579.22

Демидёнок О.И., Гончаренко А.В., Салина Е.Г., Капрельянц А.С.

БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АНТИБИОТИКОВ ЗАВИСИТ ОТ АКТИВНОСТИ ТОКСИНА VapC

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, demidenoksana@gmail.com

Резюме. Показано, что бактериостатический эффект антибиотиков частично определяется РНКазной активностью токсина VapC. Действие токсина VapC приводит к формированию фенотипической резистентности популяции, обеспечивающей выживание бактериальной культуры в присутствие антибиотиков.

Ключевые слова: токсин-антитоксин модуль, персистирующие бактерии, антибиотики.

Введение

По данным ВОЗ, каждый третий житель Земли является носителем латентного туберкулеза, потенциально способного перейти в острую форму. Высказано предположение, что возможным индуктором формирования покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis* является система токсин-антитоксин (ТА). Все ТА системы функционируют по одному принципу: стабильный токсин блокирует важнейшие клеточные функции, такие как механизмы репликации и трансляции (большинство токсинов являются РНКазами), лабильный антитоксин связывает токсин и тем самым инактивирует его. Токсин и антитоксин кодируются в одном опероне, их транскрипция саморегулируется связыванием промоторной области с ТА-белковым комплексом и таким образом поддерживается низкий уровень ТА экспрессии.

У *M. tuberculosis* ТА системы чрезвычайно множественны и представлены несколькими семействами, но преобладающим являются 38 ТА пар *vapBC* семейства, в котором токсин VapC является РНКазой и блокирует трансляцию [1]. У ближайшего родственника *M. tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, семейство *vapBC* представлено одной парой ТА генов, что делает *M. smegmatis* удобным объектом для изучения роли токсина VapC в формировании состояния покоя микобактериями.

Ранее нам удалось продемонстрировать, что токсин VapC принимает участие в формировании покоящегося состояния микобактерий. При его инактивации путём гиперэкспрессии антитоксина VapB клетки теряют способность образовывать покоящиеся формы, что является первым экспериментальным доказательством гипотезы об участии токсина VapC в формировании состояния покоя. Настоящее исследование посвящено изучению связи между бактериостатическим эффектом антибиотика тетрациклина (Tet) с активностью токсина VapC.

Материалы и методы исследования

Штаммы и условия культивирования. Объектами исследования были рекомбинантные штаммы на основе штамма *M. smegmatis* дикого типа MC2 155 (Wt): дикий штамм с плазмидой, обеспечивающей устойчивость к канамицину (Wt-pMind), штамм, трансформированный плазмидой pMind с копией гена антитоксина (pMind-*vapB*). Штаммы *M. smegmatis* поддерживали на чашках с агаризованной (1,5%) средой NB (HiMedia Lab., India). Клетки выращивали на среде NB с 0,05% Твина-80. Для поддержания рекомбинантных штаммов использовали канамицин (Km) 10 мкг/мл. Подсчет колонеобразующих единиц (КОЕ) проводили через 48 часов после высева на чашки.

В реактивации клеток использовалась среда Sauton (Connell, 1994). Бактериостатические эффекты антибиотика исследовались следующими способами: 1) Клетки рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* выращивали из 24 часового инокулята (1:100) при 37^{0}C в течение 18 часов, затем добавлялся Tet в концентрации 0,5 мкг/мл и снимались показания оптической плотности каждые 24 часа. 2) К 24 часовой культуре добавлялся Tet в концентрации 12,5 мкг/мл. Определение КОЕ проводилось до внесения антибиотика и после внесения через 24 часа. Реактивация культуры проводилась через 24 часа после внесения Tet в среде Sauton путем серийных разведений. Через сутки реактивации клетки высевались для подсчета КОЕ.

Клонирование. Амплификацию ТА локуса *VapBC M. smegmatis* осуществляли с использованием праймеров:

Up *vapBC* 5'GG**GGATCC**TGAAGGCGATCTATCAAGGTCGTATA 3', Low *vapBC* 5' GG**ACTAGT**CCGACACGGCGTGGTGATCTGAT 3'(сайты рестрикции BamHI и SpeI подчеркнуты). Продукт ПЦР первоначально клонировали в вектор pGEM-T (Promega), Гидролизовали по сайтам BsaBI, затем лигировали (удаляли большую часть *vabC*), подвергали расщеплению по сайтам BamHI и SpeI, после чего лигировали в вектор pMind, предварительно обработанный теми же рестриктазами. Правильность клонированных нуклеотидных последовательностей подтверждали секвенированием.

Результаты и обсуждения

Было обнаружено, что при внесении 0,5 мкг/мл Tet в 18-часовые культуры рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* штамм pMind-*vapB*, экспрессирующий антитоксин VapB, оказался менее чувствительным к действию антибиотика, что выражалось в росте культуры в присутствии Tet, в отличие от штамма wt-pMind, рост которого подавлялся. (рис. 1). Очевидно, что такое различие в поведение штаммов связано с функционированием *vapBC* системы ТА. Мы предполагаем, что воздействие антибиотика индуцирует активность токсина VapC и клетки штамма wt-pMind теряют репликативную способность. Штамм pMind-*vapB* с инактивированным гиперэкспрессией антитоксина токсином сохраняет репликативную способность. При внесении 12,5 мкг/мл Tet в 24-часовые культуры рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* наблюдалось падение КОЕ, но штамм pMind-*vapB*, экспрессирующий антитоксин, сохранял КОЕ на 1-3 порядка выше, чем штамм wt-pMind. Однако после реактивации бактериальных клеток штамм Wt-pMind проявил способность к восстановлению колонеобразующей способности в большей степени, чем штамм, экспрессирующий антитоксин (рис 2). Видимо, индуцированный антибиотиком эффект токсина (потеря репликативной способности) является обратимым. Можно предположить, что токсин участвует в формировании так называемой популяции персистирующих клеток.

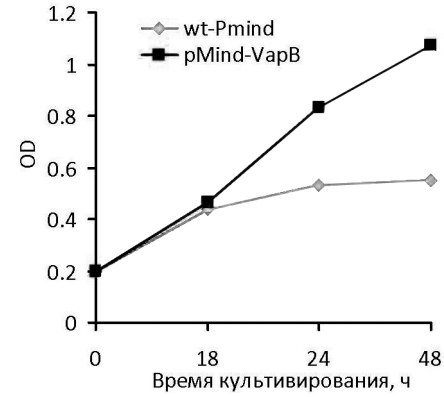


Рис. 1. Бактериостатическое действие антибиотика Tet (0,5 мкг/мл) на рекомбинантные штаммы *M. smegmatis*.

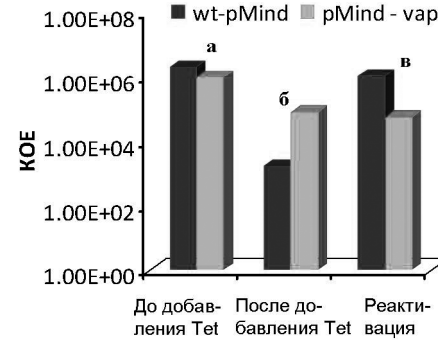


Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* до добавления антибиотика Tet (а), после добавления антибиотика Tet (б) и после реактивации (в).

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что бактериостатический эффект антибиотиков частично обусловлен запуском бактериаль-

ных механизмов ухода от повреждающих внешних факторов за счет РНКазной активности токсина VapC, что приводит к формированию популяции персистирующих клеток, обеспечивающей выживание бактериальной культуры в присутствии антибиотиков.

Работа выполнена при поддержке ГК №14.740.11.08.01, 14.740.11.0246, 14.740.11.1056 и РФФИ 11-04-00713-а и №11-04-01440-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ahidjo B.A., Kuhnert D., McKenzie J.L., Machowski E.E., Gordhan B.G., Arcus V., Abrahams G.L., Mizrahi V.* VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins // PLoS One. – 2011. – V. 6(6). – E: 21738.

Demidenok O.I., Goncharenko A.V., Salina E.G., Kaprelyants A.S.

BACTERIA STATIC EFFECT OF ANTIBIOTICS DEPENDS ON TOXIN VapC ACTIVITY

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow, Russia,

demidenoksana@gmail.com

Summary. A bacteria static effect of antibiotics was shown to be influenced partially by RNAse activity of toxin VapC. VapC action was found to result in the formation of persistors which provide the survival of the bacterial culture in the presence of antibiotics.

Key words: toxin – antitoxin modul, persisted bacteria, antibiotics.

УДК 637.1

Иркитова А.Н.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ШТАММОВ АЦИДОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СОСТАВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Алтайский государственный университет», г. Барнаул, Россия, Elen171987@mail.ru

Резюме. Установлено, что все исследованные штаммы *Lactobacillus acidophilus* проявляют антагонистический эффект к тест-штаммам *Escherichia coli*. Нейтрализация молочной кислоты ослабляет этот эффект.

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli,* антагонизм, молочная кислота.

Введение

Ацидофильная палочка (*Lactobacillus acidophilus*) является типичным представителем облигатной лактофлоры кишечника человека, и ее штаммы, обладающие выраженным антагонизмом к патогенным и гнилостным микробам, успешно применяют в детских и диетических молочных продуктах для нормализации кишечного микробиоценоза.

Цель данного исследования – установить пригодность коллекционных штаммов *L. acidophilus* для включения в пробиотические продукты. Критерием оценки служила их антагонистическая активность по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli*, а также устойчивость к желчи и биосовместимость штаммов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 11 штаммов *Escherichia coli* из коллекции Сибирского научно-исследовательского института сыроделия, в том числе 3 дубликата промышленного штамма 317/402 («Нарине»), полученные из разных источников. Тест-штаммами кишечной палочки служили коллекционный штамм Pb-6 и штамм А-1, выделенный нами из творога. Антагонистическую активность оценивали тремя разными методами: (I) метод перпендикулярных штрихов, (II) выращивание тест-штамма в жидкой селективной среде Кесслера в присутствии испытуемых штаммов ацидофильной палочки и (III) модифицированный метод капель, заключающийся в нанесении капель 10-кратных разведений тест-штамма на поверхность агаровой среды, свежезасеянной культурой испытуемого штамма ацидофильной палочки, с последующей инкубацией и визуальным учетом роста тест-штамма в зависимости от его разведения.

Результаты и обсуждение

При тестировании антагонистической активности методом перпендикулярных штрихов наиболее значительные зоны ингибирования *E. coli* (до 8,5-13,5 мм) дали штаммы 317/402 (исх.), 97 и Ом, а наименьшие (не более 2,5 мм) – штаммы НВМ-3 и ВМ-2. В целом, сходные результаты распределения исследуемых штаммов по степени антагонистической активности были получены при использовании и двух других из вышеуказанных методов тестирования. Исключение представляли два из трех дубликатов штамма 317/402 («Вектор» и «Омский»), а также штамм «Угличский». Указанные дубликаты штамма 317/402 существенно уступали штамму 317/402 (исх.) при тестировании методом перпендикулярных штрихов и незначительно - при использовании двух других методов тестирования. В свою очередь, штамм «Угличский» проявил выраженный антагонизм при испытаниях чашечными методами и относительно слабый – при его добавлении в жидкую среду Кесслера.

Для исключения влияния молочной кислоты, продуцируемой исследуемыми штаммами ацидофильной палочки, на вызываемый ими антагонистический эффект был поставлен специальный эксперимент, в котором в жидкую среду Кесслера с тест-штаммом кишечной палочки вносили культуры *L. acidophilus*, нейтрализованные стерильным раствором NaOH. Нейтрализация культур привела к заметному ослаблению ингибирования тест-штаммов кишечной палочки у всех исследованных штаммов *L. acidophilus*, за исключением штаммов «Угличский» и Ом, однако в целом не изменила порядок распределения исследуемых штаммов по степени проявления ими антагонистической активности.

Проявление антагонистического эффекта в аэробных и анаэробных условиях исследовали при использовании модифицированного метода капель; для создания анаэробных условий чашки Петри с посевами помещали в анаэростаты. Все исследованные штаммы ацидофильной палочки в анаэробных условиях проявляли значительно более сильный антагонистический эффект, чем в аэробных. Особенно сильный прирост активности наблюдался у штаммов 97 и Ом (которые в этих условиях оказались самыми сильными антагонистами), а наименьший – у штаммов «Угличский» и ВМ-2.

Влияние pH на антагонистическую активность исследуемых штаммов ацидофильной палочки изучали путем совместного культивирования с тем или иным тест-штаммом *E. coli* в бульоне из гидролизованного молока с разными исходными значениями pH среды (от 5 до 9) с последующим учетом титра кишечной палочки. Установили, что наибольшую антагонистическую активность исследуемые штаммы проявляют при pH 5 и сохраняют ее на высоком уровне при pH 6-8, в то время как при pH 9 эта активность резко снижается или полностью исчезает. Важно отметить, что исследованные штаммы *L. acidophilus* существенно различались по реакции на изменение pH среды. Так, у штамма 317/402 (исх.), в отличие от двух его дубликатов, антагонистическая активность заметно ослабевала со снижением кислотности среды, два его дубликата («Вектор» и «Омский») сохраняли активность в более широком пределе pH, тогда как штаммы В-842, В-845 и Ом проявляли высокую активность даже при pH 9. Наиболее слабым антагонистом при всех указанных значениях pH среды оказался штамм «Угличский».

Следует отметить, что свежевыделенный штамм *E. coli* (А-1) оказался заметно более устойчив к антагонистическому действию всех исследованных штаммов ацидофильной палочки, чем коллекционный тест-штамм Pb-6.

Желчеустойчивость штаммов *L. acidophilus* определяли, культивируя их в бульоне из гидролизованного молока, содержащего разные концентрации медицинской желчи (0, 10, 20, 30 и 40%). Все штаммы, за исключением одного («Угличский»), росли в присутствии 10-30% желчи, хотя повышенные концентрации желчи вызвали задержку роста культур. Семь штаммов проявили высокую желчеустойчивость: они могли расти в бульоне с 40% желчи, при этом наиболее обильный рост дали штаммы 317/402 (исх.) и Ом.

Биосовместимость штаммов *L. acidophilus* проверяли методом агаровых блочков на твердой питательной среде. Зоны ингибирования обнаружили только у штаммов 97, Ом и 317/402 «Омский» и лишь по

отношению к штамму «Угличский». Таким образом, констатировали, что, за исключением штамма «Угличский», все остальные исследованные штаммы *L. acidophilus* являются биосовместимыми.

Результаты исследования коллекционных штаммов *L. acidophilus* показали, что их антагонистическая активность является индивидуальным физиологическим свойством, а степень выраженности этой активности зависит от условий, в которых они действуют на тест-штамм *E. coli* (pH среды, наличие кислорода и др.).

Заключение

В целом, наиболее активными антагонистами в разных условиях культивирования оказались штаммы 317/402 (исх.), 97 и Ом. Высокая степень биосовместимости изученных штаммов *L. acidophilus* позволяет использовать их в пробиотических продуктах в виде специально подобранных комбинаций с целью повышения стабильности и расширения спектра антагонистического действия на нежелательные микроорганизмы.

Irkitova A.N.

COMPARATIVE ESTIMATION OF THE ACIDOPHILIC ROD STRAINS FOR THE USE AS A PART OF PROBIOTIC PRODUCTS

The Altai State University, Russia, Barnaul, Elen171987@mail.ru

Summary. It is established that all investigated strains of *L. acidophilus* show antagonistic effect to test-strains of E. coli. Neutralization of dairy acid was found to weaken the antagonistic effect.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli*, antagonism, lactic acid.

УДК 579.22

Караваева Е.А.[1,2], Нестерова Л.Ю.[2], Ткаченко А.Г.[1,2]

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ – ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ УЧАСТИЯ ПОЛИАМИНОВ В РАЗВИТИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *ESCHERIHIA COLI*

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, karavaeva.elena2009@yandex.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, larisa.nesterova@bk.ru, agtkachenko@iegm.ru

Резюме. Анализ природных штаммов *Escherichia coli* показал, что микроорганизмы, устойчивые к действию фторхинолонов, обладают повышенной способностью к биоплёнкообразованию и высокой активностью орнитиндекарбоксилазы – ключевого фермента системы синтеза полиаминов. Показано, что сублетальные концентрации фторхинолонов стимулируют биоплёнкообразование. Полиамины, путресцин и спермидин оказывают стимулирующее действие на способность к биоплёнкообразованию у штаммов с разной степенью устойчивости к фторхинолонам как в присутствии антибиотика, так и в его отсутствие.

Ключевые слова: фторхинолоны, биопленки, полиамины, антибиотикорезистентность.

В настоящее время в микробиологии и медицине наиболее актуальной проблемой является развитие антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов. Особое внимание направлено на широко используемые в клинической практике антибиотики из группы фторхинолонов. Основной мишенью для антибиотиков данного ряда в клетках *Escherichia coli* служит ДНК-гираза, а одной из основных причин бактерицидного действия – фрагментация ДНК [1]. В последнее время возрос интерес к полиаминам, алифатическим углеводородам с двумя и более аминогруппами [2] как факторам, которые участвуют в формировании адаптивного ответа на различные виды стрессов [3]. Установлено, что эти биогенные поликатионы также являются факторами развития неспецифической антибиотикорезистентности [4]. Одним из возможных механизмов участия полиаминов в развитии лекарственной устойчивости является регуляция биопленкообразования. Биопленки представляют собой микробные сообщества, образованные клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матрикс синтезированных ими полимерных веществ [5]. Согласно данным литературы, микроорганизмы в составе биопленки проявляют 10-1000-кратное возрастание уровня антибиотикорезистентности [5].

Целью настоящей работы явилось исследование возможной роли полиаминов в развитии лекарственной устойчивости природных штаммов *E. coli* к левофлоксацину посредством участия в биопленкообразовании. В экспериментах использовались природные клинические изоляты *E. coli*, а также штаммы, выделенные на птицеводческих предприятиях Пермского края. Штаммы были условно подразделены на 3 группы (чувствительные, переходные, устойчивые) согласно значениям минимальной ингибиторной концентрации (МИК) левофлоксацина [6].

Одним из главных показателей функционирования полиамин-синтезирующей системы является активность орнитиндекарбоксилазы (ОДК). ОДК – ключевой фермент синтеза путресцина и спермидина, его активность непосредственно коррелирует с содержанием в клетке полиаминов. Полученные данные демонстрируют двукратное повышение активности орнитиндекарбоксилазы в группе переходных и устойчивых штаммов относительно контрольной группы.

Уровень биопленкообразования был проанализирован в разных группах чувствительности к фторхинолону. В процессе исследования обнаружена прямая зависимость между уровнем биопленкообразования и степенью устойчивости к левофлоксацину. Наиболее высокий уровень биопленкообразования наблюдается в группе переходных и устойчивых штаммов.

Добавление сублетальной концентрации левофлоксацина к культуре микроорганизмов стимулировало биопленкообразование штаммов, относящихся ко всем уровням устойчивости. Для группы чувствительных и переходных штаммов прослеживается статистически значимое двукратное возрастание уровня биопленкообразования.

На каждом из представленных уровней устойчивости экзогенные полиамины способствовали повышению биопленкообразования. Эксперименты, в ходе которых производилась добавка полиаминов к культуре, содержащей сублетальную концентрацию левофлоксацина, показали более интенсивное биопленкообразование по сравнению с биопленкообразованием в культуре, не содержащей антибиотик.

Таким образом, исследования показали, что в природных штаммах *E. coli* с увеличением уровня устойчивости происходит возрастание активности полиамин-синтезирующей системы, а также способности к формированию биопленок. Раздельное и совместное действие экзогенных добавок полиаминов и сублетальной концентрации левофлоксацина оказывают стимулирующий эффект на биопленкообразование. На основании этого можно сделать вывод, что повышенное накопление полиаминов в природных штаммах *E. coli* обусловливает возрастание их резистентности к фторхинолонам посредством положительной регуляции биопленкообразования.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 11-04-96001) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (проект № 01200963690).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. // Изд-во МГУ; Наука. – 2004. – С. 528.

2. *Igarashi K., Kashiwagi K.* Polyamines: mysterious modulators of cellular functions // Biochem. Biophis. Res. Commun. – 2000. – V. 271. – P. 559–564.

3. *Tkachenko A., Nesterova L., Pshenichnov M.* The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli* // Arch Microbiol. – 2001. – V. 176. – P. 155–157.

4. *Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В.* Адаптивные функции полиаминов *E.coli* при сублетальных воздействиях антибиотиков // Микробиология. – 2009. – Т.78. №.1.– С. 32–41.

5. *Naves P., Prado G., Huelves L., Gracia M.* Correlation between virulence

factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains // Microbial Pathogenesis. – 2008. – V. 45. – P. 86–91.
6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04 // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2004. – Т. 6. – С. 306–359.

Karavaeva E.A.[1,2], Nesterova L.Yu.[2], Tkachenko A.G.[1,2]

BIOFILM FORMATION IS ONE OF THE ANTIBIOTIC RESISTANCE MECHANISMS REGULATED BY POLYAMINES IN *ESCHERICHIA COLI ISOLATES*

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, karavaeva.elena2009@yandex.ru;
[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, larisa.nesterova@bk.ru, agtkachenko@iegm.ru

Summary. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates were shown to have an elevated ability to form biofilms and possess increased activity of ornithine decarboxylase, the key enzyme in polyamine synthesis. Up-regulation of biofilm formation under sublethal fluoroquinolone treatment was observed. Putrescine and spermidine were found to have positive effect on biofilm formation in strains with different levels of levofloxacin resistance both in the presence of this antibiotic and its absence.
Key words: fluoroquinolones, biofilms, polyamines, antibiotic resistance.

УДК 579.841.11

Караваева О.А.[1], Гулий О.И.[1], Павлий С.А.[2], Володин Д.Ю.[2], Буров А.М.[1], Игнатов О.В.[1]

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГА AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP7

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия, guliy_olga@mail.ru;
[2]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов, Россия

Резюме. Выделен бактериофаг из клеток *Azospirillum brasilense* Sp7, описана его морфология, характеристика негативных колоний, определен диапазон литического действия в отношении других штаммов и видов азоспирилл. С помощью электронной микроскопии установлено, что фаг (капсид) имеет нитевидную форму.
Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, бактериофаг, электронная микроскопия.

Введение

Бактериофаги бактерий, обитающих в окружающей среде, изучены мало, несмотря на то, что их роль в контроле численности бактерий и участие в горизонтальном переносе генов весьма велика [1]. К почвенным бактериям, способствующим росту растений, относятся бактерии, принадлежащие к роду *Azospirillum*. К настоящему времени описаны 2 умеренных фага, способных инфицировать бактерии рода *Azospirillum* [3, 4]. Недавно французскими исследователями были выделены и описаны бактериофаги из 24 штаммов 4-х видов бактерий, принадлежащих к роду *Azospirillum* [5].

Цель настоящей работы – выделение из культуры клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 бактериофага и исследование его свойств.

Материалы и методы исследования

В работе использовали *Azospirillum brasilense* штаммы Sp7, Sr75, Sr65, Sr55, Sp245, Cd и *Azospirillum lipoferum* Sp59b, полученные из коллекции культур ИБФРМ РАН.

Выделение бактериофагов из клеток *A. brasilense* Sp7 проводили по методике, описанной [6]. Морфологию негативных колоний бактерий, зараженных фагами, изучали при посевах методом агаровых слоев (метод Грация) [6]. Диапазон литической активности и специфичность селектированных фагов определяли методом нанесения фага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур [6]. Для электронно-микроскопической идентификации выделенных бактериофагов из клеток *A. brasilense* Sp7 готовили препараты бактериофагов с концентрацией фаговых частиц ~106 частиц/мл [7]. Контрастирование проводили уранил ацетатом (1% УА в 50% метиловом спирте) в течение 5 мин.

Результаты и обсуждение

Из клеток *A. brasilense* Sp7 были выделены бактериофаги и проведено их титрование методом агаровых слоев. Выделенный бактериофаг на газоне индикаторного штамма *A. brasilense* Sp7 образовывал округлые, с ровным четким краем, прозрачные негативные колонии диаметром от 0,1 до 0,2 мм. Анализ выращенных культур после длительного культивирования (до 5 суток) показал, что пятна остаются прозрачными. При изучении спектра литического действия выделенного бактериофага установлено, что он проявляет активность в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp7, Sr65 и Sr55 и не активен в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp245, Cd, Sr75 и *A. lipoferum* Sp59b.

Электронно-микроскопическое изучение исследуемого материала бактериофага показало, что он имеет изометрическую головку и хвостовой отросток. Представленные результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями [5].

Заключение

В результате проведенных исследований был выделен бактериофаг азотфиксирующих микроорганизмов *A. brasilense* Sp7, который отличался низкой репродуктивной способностью, поскольку выделялся только после воздействия на клетки низкой температуры. На газоне индикаторной культуры полученный бактериофаг образовывал прозрачные негативные колонии. Бактериофаг проявлял активность в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp7, Sr65 и Sr55, при этом был не активен в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp245, Cd, Sr75, и *A. lipoferum* 59b. На основании электронно-микроскопического исследования сделано предположение о том, что бактериофаг, выделенный из клеток *A. brasilense* Sp7, относится к семейству нитчатых фагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Suttle C.A.* Viruses in the sea // Nature. – 2005. – V. 437. – P. 356–361.
2. *Elmerich C., Quiviger B., Rosenberg C., Franche C., Laurent P., Döbereiner J.* Characterization of a temperate bacteriophage for *Azospirillum*. // Virology. – 1982. – V. 122. – P. 29–37.
3. *Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment // Genome Res. –1998. – V. 8. – P. 175–185.
4. *Germida J.J.* Spontaneous induction of bacteriophage during growth of *Azospirillum brasilense* in complex media // Can. J. Microbiol. – 1984. – V .30. – P. 805–808.
5. *Boyer M., Haurat J., Samain S., Segurens B., Gavory F., González V., Mavingui P., Rohr R., Bally R., Wisniewski-Dyé F.* // Bacteriophage prevalence in the genus *Azospirillum* and analyses of the first genome sequence of an *Azospirillum brasilense* integrative phage // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. № 3. – P. 861–874.
6. *Адамс М.* Бактериофаги. – М: Иностранная литература, 1961. – 272 с.
7. *Ackermann H.-W.* Bacteriophages methods and protocols: isolation, characterization, and interaction. / Eds by Martha R.J. Clokie, Andrew M. Kropinski. – Humana Press, 2005. – V. 1. – P. 113–126.

Karavaeva O.A.[1], Guliy O.I.[1], Pavliy S.A.[2], Volodin D.Yu.[2], Burov A.M.[1], Ignatov O.V.[1]

A BACTERIOPHAGE FROM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP7

[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov, Russia, guliy_olga@mail.ru;
[2]N.G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

Summary. A bacteriophage was isolated from *Azospirillum brasilense* Sp7 cells. Its mmorphology and negative colony characteristics were described; a range of lytic action against other *Azospirillum* strains and species was determined. The results of electron microscopy showed that the phage (capsid) was filamentous.
Key words: *Azospirillum brasilense*, bacteriophage, electron microscopy.

УДК 615.281.03:616.24-002].07

Катрецкая Г.Г., Морозова Н.С., Гулая О.А.

ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИСЕПТИКОВ ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЯХ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера» Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, rector@psma.ru

Резюме. В эксперименте *in vitro* изучена эффективность антисептиков против микрофлоры нижних дыхательных путей у пациентов с внебольничными пневмониями. Показан высокий уровень чувствительности бактериальных и грибковых культур к антисептикам. Дана оценка влияния антисептиков на активность фагоцитов периферической крови. Выявлена низкая токсичность изученных препаратов в отношении фагоцитарной функции лейкоцитов. Обоснована возможность применения антисептиков для лечения внебольничных пневмоний.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, микрофлора, фагоцитоз, антисептики.

Введение

Важной тенденцией в современной пульмонологии являются серьезные изменения структуры этиологических агентов при внебольничных пневмониях: все чаще ими становятся различные условно-патогенные микроорганизмы (УПМ). Наличие лекарственной устойчивости, антагонистической активности, факторов персистенции и адгезии, способности к пленкообразованию придает этим микробам высокую экологическую пластичность и повышает их патогенный потенциал. Резистентность УПМ может включать в себя устойчивость к антисептикам, поскольку эти препараты используются в клинике в виде бронхиальных заливок или ингаляций. Недостатком антисептиков считается токсичность, поэтому важно оценить их влияние на фагоцитарную функцию лейкоцитов, являющуюся важнейшим врожденным механизмом защиты от инфекционных агентов.

Цель исследования – лабораторное обоснование возможности применения антисептиков для лечения внебольничных пневмоний. В задачи работы входили изучение чувствительности УПМ дыхательных путей к антисептикам, а также оценка влияния антисептиков на показатели фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови здоровых людей и больных внебольничной пневмонией.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – микробные культуры, выделенные от больных внебольничными пневмониями, в концентрации не ниже 10^6 КОЕ/мл для мокроты или 10^4 КОЕ/мл для бронхоальвеолярного лаважа – всего 105 микробных культур. Антисептикочувствительность исследовали методом серийных разведений с использованием хлоргексидина, мирамистина, фурациллина и диоксидина. Определив минимальную подавляющую концентрацию, рассчитывали индекс активности антисептиков (ИАА) – отношение рабочей концентрации препарата к МПК культуры.

Влияние антисептиков на фагоцитоз изучено на 22 образцах крови: 12 пробах от клинически здоровых волонтеров (группа 1) и 10 – от больных внебольничной пневмонией (группа 2). По демографическим показателям группы были сопоставимы (средний возраст в обеих группах составлял 20,8±1,2 года). Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали модифицированным методом В.Н. Каплина с использованием в качестве объекта фагоцитоза формалинизированных эритроцитов барана (ФЭБ).

Проведено 2 серии опытов, где воздействию антисептиков подвергали либо ФЭБ (20 мин при 37°С), после чего осуществляли их взаимодействие с пробами крови, либо образцы крови (20 мин при 37°С) перед добавлением объекта фагоцитоза. Таким образом, в первом случае наблюдали влияние антисептиков на объект фагоцитоза, во втором – действие препаратов на лейкоциты. Рассчитывали процент активных (фагоцитирующих) лейкоцитов и фагоцитарный индекс. В контроле использовали изотонический раствор хлорида натрия.

Статистическую обработку проводили в программе «Биостат» с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ показал высокую активность всех препаратов. Так, к хлоргексидину было чувствительно 98,6% культур стафилококков, к мирамистину – 89%, а к диоксидину и фурациллину – 80 и 55%. В большинстве случаев (табл. 1) значения индекса активности препаратов намного превышали минимальный уровень (ИАА=4), необходимый для эффективного воздействия на микрофлору слизистых. Достаточно высокими были показатели ИАА против коагулазонегативных стафилококков (КНС) и энтеробактерий. Эффективными против неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ) были хлоргексидин и диоксидин, а против грибов рода *Candida* – хлоргексидин и мирамистин.

Таблица 1.

Индекс активности антисептиков против различных групп УПМ, M±m

	Staphylococcus aureus	КНС	Энтеробактерии	НФГОБ	*Candida albicans*
Хлоргексидин	397,8±50,4	422,4±51,8	148,4±46,1	138,9±51,7	57,1±10,6
Диоксидин	201,9±35,8	203,6±49,5	264,6±59,4	356,6±70,6	≤ 4
Фурациллин	37,2±22,4	29,9±5,8	7,0±2,0	≤ 4	≤ 4
Мирамистин	35,9±8,6	69,5±44,2	4,4±1,2	≤ 4	9,4±2,5

Важно, что чувствительность к антисептикам была свойственна и культурам с лекарственной устойчивостью. Это еще раз подтверждает перспективность клинического использования антисептиков, особенно при низкой эффективности антибиотикотерапии.

Показатели фагоцитоза (табл. 2) у больных пневмонией оказались закономерно выше, чем у здоровых лиц. Антисептики в обеих сериях не изменяли активность фагоцитирующих клеток. Исключение составили фурациллин и диоксидин (снижение процента активных фагоцитов), а также мирамистин, оказавший легкий стимулирующий эффект.

Таблица 2.

Влияние антисептиков на показатели фагоцитарной активности лейкоцитов, M±m

Препараты	Серия	Процент активных фагоцитов, %		Фагоцитарный индекс	
		Здоровые	Больные	Здоровые	Больные
Хлоргексидин	1	45,1±5,4	58,0±4,2	1,4±0,06	1,6±0,1
	2	47,6±5,5	60,7±7,6	1,4±0,09	1,7±0,1
Мирамистин	1	52,6±6,4*	61,6±6,9	1,4±0,1	1,8±0,2
	2	47,6±4,4	61,0±5,8	1,3±0,08	1,6±0,1
Фурациллин	1	35,8±3,1*	46,2±4,1	1,3±0,06	1,7±0,2
	2	45,4±4,3	61,3±5,6	1,3±0,09	1,6±0,1
Диоксидин	1	**	39,3±2,5*	**	1,4±0,1
	2	**	52,5±1,9	**	1,5±0,1
Контроль (физ. раствор)	1	39,1±4,1	49,0±4,5	1,2±0,07	1,5±0,04
	2	42,5±3,6	59,2±4,0	1,3±0,05	1,6±0,1

Примечание. *Различия опыт/контроль статистически значимы; **влияние диоксидина в группе здоровых лиц не изучалось.

Заключение

Таким образом, результаты исследования можно считать дополнительным аргументом в пользу возможного применения антисептиков для лечения внебольничной пневмонии и ее осложнений, в том числе, вызванных полирезистентными микроорганизмами.

Katretskaya G.G., Morozova N.S., Gulaya O.A.

LABORATORY ASPECTS OF USING ANTISEPTICS IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIAS

Academician E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, rector@psma.ru

Summary. In experiment *in vitro* the efficiency of antiseptics against the microflora of the lower respiratory tract in patients with community-acquired pneumonias was studied. High level of sensitivity of bacterial and fungous cultures to antiseptics was shown. Estimation of the effect of antiseptics on the activity of peripheral blood phagocytes was made. Low toxicity of the investigated preparations in relation to phagocytic function of leukocytes was revealed. Possibility of using antiseptics for the treatment of patients with community-acquired pneumonia was proved.

Key words: community-acquired pneumonia, microflora, phagocytosis, antiseptics.

УДК 579.841.11:579.61

Козюкова К.В.[1], Кузнецова М.В.[1,2], Карпунина Т.И.[1]

ПРОДУКЦИЯ ОХА-БЕТА-ЛАКТАМАЗ НОЗОКОМИАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И *ACINETOBACTER BAUMANNII*

[1]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздравсоцразвития, г. Пермь, Россия, karpuninapsma@mail.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, mar@iegm.ru

Резюме. Изучена устойчивость к бета-лактамным антибиотикам 215-ти нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Специфическая амплификация с праймерами к bla_{OXA} получена у 19-ти культур (8,8%). Сравнение нуклеотидных bla_{OXA} и аминокислотных последовательностей выявило продуцентов оксациллиназ ОХА-14. Бета-лактамазы ОХА-50с и ОХА-50g обнаружены только у штаммов *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: бета-лактамные антибиотики, ОХА-бета-лактамазы, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii.*

Введение

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) – *P. aeruginosa* и *A. baumannii* – являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. Устойчивость этих видов ко многим бета-лактамным антибиотикам (БЛА) реализуется с помощью разнообразных природных механизмов, в том числе путем ферментной инактивации бета-лактамазами [1]. Ферменты молекулярного класса D (ОХА-бета-лактамазы, оксациллиназы) впервые обнаружены у *P. aeruginosa*, и в ряде работ отмечается проявление высокой ферментативной активности именно этими бактериями [2, 3]. Описаны многочисленные случаи выделения ферментов этой группы и у *A. baumannii*. В настоящее время существует 158 различных ОХА-бета-лактамаз, 9 из которых являются бета-лактамазами расширенного спектра и, по меньшей мере, 48 считаются карбапенемазами [4, www.lahey.org/Studies]. Для понимания механизмов развития устойчивости к БЛА и учитывая, что все большее число оксациллиназ обнаруживается в природе, представляет интерес изучение их разнообразия.

Цель работы – оценить распространенность продуцентов оксациллиназ среди неферментирующих грамотрицательных бактерий, циркулирующих в хирургических стационарах.

Материалы и методы исследования

Изучено 215 штаммов НГОБ (*P. aeruginosa* – 171, *A. baumannii* – 44), выделенных в 2008-2011 гг. от больных хирургических стационаров г. Перми и г. Екатеринбурга. Определение чувствительности бактерий к БЛА проводили диско-диффузионным методом (МУК, 2004). Для амплификации гена bla_{OXA-10} и его производных (фенотип ESBL) были использованы праймеры ABD1/ABD4, предложенные L.M.C. Hall *et al*. (1993), для bla_{OXA-50} (карбапенемазы) – праймеры A/AS, предложенные D. Girlich *et al*. (2004). Анализ генов и поиск гомологичных последовательностей осуществляли, используя программы BLAST и базы данных GenBank/EMBL/DDBJ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Результаты и обсуждение

Установлено, что к БЛА были устойчивы 185 (86,1%) штаммов коллекции. В том числе к цефтазидиму – 142 (66,0%), цефепиму – 154 (71,6%), меропенему и/или имипенему – 144 (66,9%) штамма НГОБ. Штаммы, резистентные хотя бы к одному БЛА, были взяты для молекулярно-генетических исследований. На матрице ДНК 13 штаммов (9 – *A. baumannii,* 4 – *P. aeruginosa*) путем ПЦР с праймерами ABD1/ABD4 детектированы фрагменты ДНК, соответствующие размеру участка генов (775 п.н.), кодирующих bla_{OXA} (рис. 1А). Специфичная амплификация с праймерами A/AS (фрагмент 869 п.н.) обнаружена у 6 штаммов только *P. aeruginosa*, изолированных из разных стационаров (рис. 1Б).

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов, полученных с праймерами ABD1/ABD4, восьми изолятов разных геномогрупп (5 – *A. baumannii*, 3 – *P. aeruginosa*) показал, что исследуемые участки ДНК размером 682-721 п.н. были на 99-100% сходны с последовательностью *blaOXA-14* (*P. aeruginosa* 455, GenBank L38523.1). Сравнение нуклеотидных последовательностей, полученных с праймерами A/AS, выявило, что 5 штаммов *P. aeruginosa* имеют последовательность *blaOXA-50c* (*P. aeruginosa* IND, GenBank AY306132.1) и один *blaOXA-50g* (*P. aeruginosa* ST235, GenBank AM117127.1).

Заключение

Таким образом, среди НГОБ, циркулирующих в стационарах г. Перми и Екатеринбурга выявлены продуценты оксациллиназ ОХА-14, ОХА-50с, ОХА-50g. У *A. baumannii* устойчивость к бета-лактамам обеспечивается продукцией оксациллиназ в большей степени, чем у *P. aeruginosa*, которая, по-видимому, синтезирует бета-лактамазы иных классов и/или использует другие механизмы, обеспечивающие ее антибиотикорезистентность.

Работа поддержана грантом РФФИ №11-04-96001.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Эйдельштейн М.В.* Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2001. – Т. 3. №3. – С.223-242.

2. *Hall L.M.C., Livermore D.M., Gur D.* et al. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE- 2) b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents. Chemother. – 1993. – V. 37. – P.1637-1644.

3. *Danel F.L., Hall L.C.M., Gur D., Livermore D.M.* OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. – 1995. –V. 39. – P. 1881-1884.

4. *Bush K., Jacoby G. A.* Updated Functional Classification of в-Lactamases // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2010. –V. 54. – P. 969-976.

Kozjukova K.V.[1], Kuznetsova M.V.1,[2], Karpunina T.I.[1]

PRODUCTION OXA-BETA-LACTAMASES OF NOSOCOMIAL STRAINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII*

[1]Academician E.A. Vagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, karpuninapsma@mail.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia, mar@iegm.ru

Summary. Studied resistance to beta-lactams antibiotics 215 of nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The specific amplification with the primers to bla_{OXA} obtained from 19 cultures (of 8.8%). A comparison of nucleotide bla_{OXA} and amino acid sequences found producents of oxacillinases bla_{OXA-14}. Beta-lactamases OXA-50c and OXA-50g detected only in strains of the *P. aeruginosa*.

Key words: β-lactams, oxacillinases, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii.*

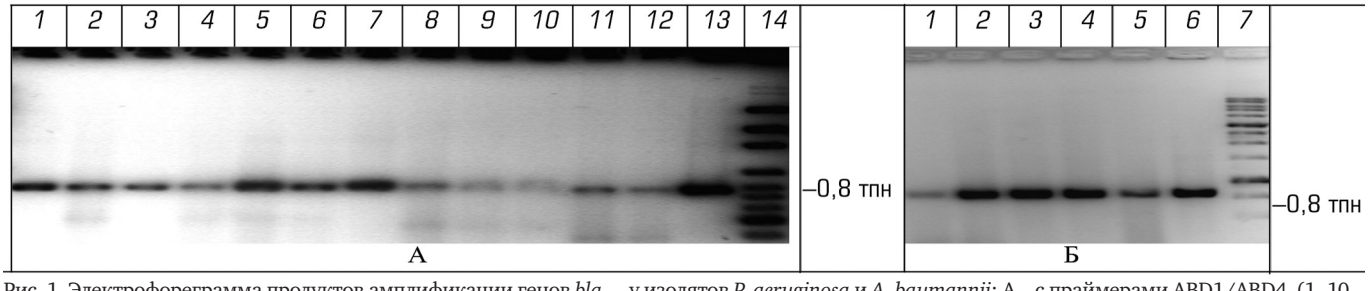


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов bla_{OXA} у изолятов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*: А – с праймерами ABD1/ABD4 (1- 10 – изоляты из ГКБ, 11-13 – изоляты ЛКБ; 14 – маркер молекулярных масс 1 kb Ladder DNA («Силекс», Россия)); Б – с праймерами A/AS (изоляты выделены из 1,2 – ГКБ; 3,4 – ЕГКБ; 5-6 – ККБ)

УДК 579.26

Корляков К.А., Арсентьева Н.Ю., Нохрин Д.Ю.

ВЛИЯНИЕ СЛОЖНОСТИ РЕЛЬЕФА СТЕКОЛ НА ФОРМИРОВАНИЕ МОНОКУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия, Korfish@mail.ru

Резюме. Исследована динамика роста численности бактерий двух видов на стеклах с различной сложностью микрорельефа. Установлено, что рост численности бактерий более интенсивен на стеклах с неровной поверхностью. В углублениях микрорельефа численность бактерий выше, чем на возвышенностях.

Ключевые слова: стекла, углубления, возвышенности, численность, *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis*.

Введение

Метод «стекла обрастания» по Н.Г. Холодному, пришедший из почвоведения в почвенную микробиологию, гидробиологию и другие науки, используется достаточно широко в экологических исследованиях. Однако влияние сложности рельефа стекол на формирование структурно-функциональных характеристик культур микроорганизмов ранее практически не изучалось. Вместе с тем, в фундаментальной экологии в последние годы активно разрабатывается концепция ландшафтного и «горного» экотонов, где характерный «эффект сгущения» возникает на неоднородностях и сложностях рельефа в отличие от экотонов, возникающих на границах раздела фаз [1]. В микробиологии часто используют понятие «геохимический барьер», близко коррелирующее с термином «экотон» [2]. Цель настоящей работы - исследование особенностей формирования монокультур микроорганизмов на стеклах с неровной поверхностью.

Материалы и методы исследования

В работе использовали культуры бактерий *Staphylococcus aureus* 25923 и *Enterococcus faecalis* 259212. Предметные стекла были разделены на 5 секторов, на которых абразивной шкуркой наносили углубления различной толщины: 7,8 мкм, 23,4 мкм, 78,0 мкм и 235,0 мкм. Расстояния между углублениями составляли соответственно: 78 мкм, 195 мкм, 312 мкм и 585 мкм. Пятый сектор оставался необработанным (ровным) и использовался в качестве контроля. В качестве жидкой фазы для выращивания микроорганизмов использовали мясопептонный бульон (МПБ). Культивирование осуществляли при 37°С в одноразовых чашках Петри, содержащих по 20 мл питательной среды. Первые результаты в трехкратной повторности снимали через 1, 2, 3, 4, 5, 10, 24 ч. Влияние различных факторов на численность бактериальных клеток определяли с помощью многофакторного дисперсионного анализа в программе STATISTICA 6.1. Достоверные различия в количестве бактериальных клеток определяли с помощью F-критерия.

Результаты и обсуждение

По нашим данным, численность клеток бактерий, используемых в работе, была значительно выше в области, где поверхность стекла механически нарушена (с 1 по 4 секторы), по сравнению с контролем на протяжении всего периода инкубации. Как видно из табл. 1 и 2, рост бактерий в углублениях микрорельефа стекла значительно превышал данные показатели по росту бактерий на возвышенностях. В ходе трёхфакторного дисперсионного анализа установлено, что различия между ростом золотистого стафилококка в «углублениях» и на «возвышенностях» микрорельефа были высоко статистически значимыми: $F[1; 96]=47,5$; $P<0,001$. Аналогичная закономерность выявлялась и для фекального энтерококка: $F[1; 96]=18,65$; $P<0,001$. Рост бактериальных клеток на возвышенностях неоднородного рельефа стекла был ниже контрольного, как у *S. aureus* 25923, так и *E. faecalis* 259212. Тропность к секторам с бороздами может быть следствием того, что неровная поверхность позволяет бактериям иметь несколько точек прикрепления на одном полюсе, что повышает возможность колонизации данного участка. Также высокая численность бактериальных клеток на секторах со сложным микрорельефом может быть обусловлена тем, что в зоне микроуглублений стекла повышается концентрация питательных веществ.

Предварительно выявлена видовая специфика интенсивности заселения определенных секторов стекла с различным микрорельефом. Так, в углублениях микрорельефа стекла численность клеток *S. aureus* 25923 на 4 секторе на протяжении всего периода роста биопленки была максимальной. Тогда как максимальная численность клеток *E. faecalis* 259212 менялась от 1 до 4 сектора на протяжении всего периода роста биопленки. Последнее обстоятельство свидетельствует о возможной видовой специфике предпочтений различного по размеру микрорельефа стекла и различной динамической составляющей форм роста численности клеток в зависимости от рельефа. Следует отметить, что 4 сектор характеризовался самыми мелкими по размеру углублениями и наименьшей удельной поверхностью по сравнению с остальными секторами.

Выводы

1. Показано, что численность клеток *S. aureus* 25923 и *E. faecalis* 259212 в области рельефной поверхности стекла выше, чем в контроле.
2. Достоверных различий в динамике роста *S. aureus* 25923 и *E. faecalis* 259212 на различных секторах стекла со сложным рельефом не выявлено ($P>0,05$).
3. Установлено, что интенсивность роста *S. aureus* 25923 и *E. faecalis* 259212 в «углублениях» стекла выше, чем на «возвышенностях» и в контроле ($P<0,001$).
4. Выявлено наличие адгезивных «предпочтений»: клетки *S. aureus* 25923 с большей долей вероятности адгезируются в «углублениях» микрорельефа, тогда как тропность клеток *E. faecalis* 259212 приурочена к «возвышенностям».

Таблица 1.

Численность клеток *S. aureus* 25923 на разных секторах стекла в зависимости от времени

Время инкубации, ч	Контроль, клеток	Количество клеток в углублениях"				Количество клеток на "возвышенностях"			
		1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор	1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор
1	25	6	6	11	13	6	14	8	8
2	42	80	90	83	111	37	59	52	50
3	46	309	293	301	342	115	97	126	93
4	789	1064	1081	1202	1539	519	500	495	509
5	2553	3803	4084	3980	4837	2960	2750	2852	2799
10	6411	9112	8641	9093	8941	4239	4002	4089	4387

Таблица 2.

Численность клеток *E. faecalis* 259212 на разных секторах стекла в зависимости от времени

Время инкубации, ч	Контроль, клеток	Количество клеток в "углублениях"				Количество клеток на "возвышенностях"			
		1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор	1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор
1	34	5	12	69	38	5	8	35	2
2	83	34	67	49	36	68	47	58	21
3	105	120	93	97	164	31	36	22	19
4	131	133	150	229	211	70	37	84	65
5	300	1033	415	334	326	399	200	136	220
10	2183	2404	2020	5923	6233	1336	1864	2348	1970

ЛИТЕРАТУРА

1. *Соловьева В.В., Розенберг Г.С.* Современное представление об экотонах или теория экотонов // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. №6.– С. 531–549.

2. *Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии / Отв. ред. Н.Н. Колотилова; Ин-т микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348 с.

Korlyakov K.A., Arsentyeva N.Y., Nohrin D.Y.

INFLUENCE OF GLASS RELIEF ON THE FORMATION OF MICROBIAL MONOCULTURES

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia, Korfish@mail.ru

Summary. The growth dynamics of two bacterial types on glass with different microreliefs was studied. The more intensive bacterial growth was noticed on glass with an uneven surface. The increased number of bacteria was observed in the microrelief depths compared to its heights.

Key words: glass, depth, heights, number, *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis*.

УДК 579.222+577.151

Костеневич А.А., Сапунова Л.И., Черная А.Н., Черкасова Л.В.

ГИДРОЛАЗНАЯ И ТРАНСГЛИКОЗИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТИ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ РАСТУЩЕЙ КУЛЬТУРЫ *CRYPTOCOCCUS* SPECIES

Государственное научное учреждение Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси,

г. Минск, Беларусь, A.Kastsianevich@gmail.ru

Резюме. Исследована бета-галактозидазная активность культуры *Cryptococcus* species, растущей в жидких средах с лактозой, обезжиренным молоком и молочной сывороткой. Установлено, что продуцируемая дрожжами бета-галактозидаза катализирует реакции гидролиза и трансгликозилирования лактозы, причем выход синтезированных *in vivo* олигосахаридов увеличивается с повышением содержания в среде дисахарида.

Ключевые слова: *Cryptococcus*, бета-галактозидаза, олигосахариды, синтез.

Введение

Действующий в Европе запрет на использование в животноводстве и птицеводстве кормовых антибиотиков обусловливает актуальность исследований по созданию препаратов аналогичного действия, в частности, про- и пребиотиков. К числу последних принадлежат галактоолигосахариды, которые подавляют адгезию *Escherichia coli* к эпителиальным клеткам, стимулируют перистальтику кишечника и устраняют его дисфункции, способствуют усвоению кальция и магния, оказывают иммуномодулирующее, гипохолестеринемическое и гипогликемическое действие, снижают риск развития кариеса и опухолей [1]. Экономически наиболее оправданным и экологически безопасным способом получения галактоолигосахаридов является ферментативное трансгликозилирование лактозы *in vivo* и *in vitro* с участием микробных β-галактозидаз [2], в том числе продуцируемых дрожжами *Cryptococcus laurentii* IFO 0372 и *C. aurentii var. laurentii* OKN-4 (FERM-P 7629).

Ранее нами был получен изолят утилизирующих лактозу дрожжей *Cryptococcus species*. Цель настоящего исследования – характеристика бета-галактозидазной активности культуры, растущей в средах с лактозой, обезжиренным молоком и молочной сывороткой.

Материалы и методы исследования

Культура *Cryptococcus sp.* хранится в Институте микробиологии НАН Беларуси на агаризованной среде с 1,5% лактозы. Глубинное выращивание дрожжей проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180-200 об/мин) при 24-25°С в течение 72 ч. Питательная среда включала (в %): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25; K_2HPO_4 – 0,3, лактозу, сухое обезжиренное молоко или сухую молочную сыворотку (1, 4 и 6%) в качестве одного из источников углерода.

По окончании культивирования в культуральной жидкости и ее бесклеточном фильтрате определяли количество белка [3] и активность бета-галактозидазы [4].

За единицу бета-галактозидазной активности принимали количество фермента, гидролизующего за 1 мин 1 мкмоль о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида с образованием 1 мкмоля 4-нитрофенола при pH 7,0 и 40ºС. Активность бета-галактозидазы выражали в ед/мл фильтрата культуральной жидкости (ед/мл) или в ед/мг белка (удельная активность).

Разделение маркерных и ферментативно синтезированных сахаридов проводили методом восходящей ТСХ на пластинах Silufol (Kavalier, Чехия) в системе изопропанол – этилацетат – вода (2:2:1). Продукты разделения проявляли 0,2%-ным раствором β-нафторезорцина в 96%-ном этиловом спирте, содержащем 10 об.% ортофосфорной кислоты.

При статистической обработке результатов рассчитывали доверительные интервалы среднего арифметического для уровня вероятности 0,05. Разность средних величин признавалась достоверной при отсутствии перекрывания их доверительных интервалов.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам, дрожжи *Cryptococcus sp*. утилизируют лактозу в качестве единственного источника углерода и продуцируют при этом бета-галактозидазу, преимущественно клеточносвязанной локализации (таблица).

Показано, что в условиях опыта максимальным уровнем бета-галактозидазной активности гидролитического действия (0,49 ед/мл) отличается культура, растущая в среде с молочной сывороткой (4%), а трансгликозилирующего действия – в среде с лактозой (6%). Олигосахариды с молекулярной массой, существенно превышающей массу лактозы, обнаруживаются также и в культуральных жидкостях дрожжей *Cryptococcus sp.*, растущих в средах на основе молока и молочной сыворотки. Их количество повышается с повышением исходной концентрации лактозы, содержащейся в названных молочных субстратах.

Таблица.

Рост дрожжей *Cryptococcus sp*. и синтез бета-галактозидазы в средах с различными источниками углеродного питания

Источник углерода, %	Биомасса, ОП540	Внеклеточный белок, мг/мл	Активность бета-галактозидазы культуральной жидкости		
			без клеток:		с клетками:
			ед/мл	ед/мг белка	ед/мл
Лактоза: 1	1,24±0,06	0,30±0,010	0,03±0,002	0,090±0,008	0,14±0,019
4	1,95±0,08	0,28±0,012	0,07±0,004	0,257±0,021	0,24±0,021
6	1,38±0,05	0,26±0,010	0,05±0,003	0,192±0,018	0,17±0,011
Молочная 1	1,16±0,07	1,58±0,083	0,01±0,001	0,006±0,001	0,04±0,005
сыворотка: 4	1,51±0,05	3,65±0,175	0,03±0,002	0,008±0,001	0,49±0,022
6	1,58±0,04	6,0±0,154	0,09±0,004	0,015±0,004	0,10±0,004
Молоко 1	1,24±0,05	1,40±0,078	0,03±0,001	0,019±0,001	0,16±0,020
4	1,56±0,04	2,52±0,124	0,06±0,002	0,027±0,002	0,26±0,013
6	1,58±0,06	3,58±0,205	0,09±0,003	0,025±0,001	0,12±0,008

Предварительными исследованиями установлено, что введение культуральных жидкостей, содержащих олигосахариды *Cryptococcus sp.*, в рационы цыплят-бройлеров способствует устранению заболеваний их желудочно-кишечного тракта, нормализует состав микрофлоры кишечника.

Заключение

Таким образом, принимая во внимание полученные данные, продуцирующие клеточносвязанную бета-галактозидазу дрожжи *Cryptococcus sp*. после идентификации, проведения токсикологических испытаний и оптимизации условий ферментативного синтеза олигосахаридов будут использованы для создания биологически активной кормовой добавки пребиотического действия.

ЛИТЕРАТУРА

1.*Tungland B.C., Meyer D*. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food // Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety. – 2002. – V. 3. – P. 471-482.

2. *Otieno D.O.* Synthesis of β-galactooligosaccharides from lactose using microbial β-galactosidases // Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety. – 2010. – V. 9. – P. 471-482.

3. *Bradford M.M*. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 24-254.

4. *Kuby S.A., Lardy H.A.* Purification and kinetics of β-galactosidase from *E. coli*, strain K-12 // J. Amer. Chem. Soc. – 1953. – V. 75. N 4. – P. 890-896.

Kastsianevich A.A., Sapunova L.I., Chornaya A.M., Cherkasova L.V.

HYDROLASE AND TRANSGLYCOSYLASE ACTIVITIES OF BETA-GALACTOSIDASE IN GROWING CULTURE OF *CRYPTOCOCCUS* SPECIES

Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences,

Minsk, Belarus, A.Kastsianevich@gmail.ru

Summary. Beta-galactosidase activity of *Cryptococcus* species culture growing on liquid media with lactose, defatted milk and whey was examined. It was found that beta-galactosidase produced by the yeast culture catalyzed the reaction of lactose hydrolysis and transglycosylation, and the yield of oligosaccharides synthesized in vivo was augmented with the increase in disaccharide level in the media.

Key words: *Cryptococcus*, beta-galactosidase, oligosaccharides, synthesis.

УДК 579.61

Лемкина Л.М.[1], Полюдова Т.В.[1], Коробов В.П.[1], Авдеева Н.С.[2]

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ВАРНЕРИНА НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ СТАФИЛОКОККОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К АНТИБИОТИКАМ

[1] Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отдела РАН, г. Пермь, Россия, l.lemkina@iegm.ru;

[2] Муниципальная клиническая больница №7, г. Пермь, Россия.

Резюме. Чувствительность к варнерину 1977 штаммов клинических коагулазонегативных стафилококков составляет 89%. Среди полирезистентных стафилококков, устойчивых к действию 4–8 антибиотиков, рост 80% штаммов подавляется при концентрациях варнерина 8–64 мкг/мл.

Ключевые слова: коагулазонегативные стафилококки, антибиотикорезистентность, варнерин.

Введение

Стремительное распространение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам значительно снижает эффективность их лечебного воздействия и стимулирует непрерывный поиск новых соединений, способных ингибировать рост патогенных бактерий [1]. Низкомолекулярный катионный пептид варнерин, выделенный в лаборатории биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, относится к семейству лантибиотиков и обладает достаточно широким спектром антибактериального действия в отношении грамположительных микроорганизмов [2]. Задачей настоящего исследования, проведенного в 2005-10 гг. на штаммах коагулазонегативных стафилококков (КНС), полученных из клинических изолятов в бактериологической лаборатории больницы №7 г. Перми, являлась оценка эффективности действия варнерина на полирезистентные штаммы КНС.

Материалы и методы исследования

Чувствительность стафилококков к 12 антибиотическим препаратам разных классов (бензилпенициллин, гентамицин, цефалексин, тетрациклин, линкомицин, оксациллин, рифампицин, эритромицин, фузидин, левомицетин, ванкомицин, ципрофлоксацин) определяли диско-диффузионным методом [3]. Оценку антибактериального действия и определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) варнерина проводили методом двукратных разведений в иммунологических планшетах [4]. Использовали препарат гомогенного пептида, полученный очисткой методом ВЭЖХ [2].

Результаты и обсуждение

Чувствительность к варнерину выявлена у 1760 клинических штаммов КНС. Резистентностью к пептиду обладали 217 штаммов (11%). Распределение чувствительных к варнерину клинических штаммов КНС представлено в табл. 1.

Из общего количества исследованных КНС выделены полирезистентные штаммы, обладающие устойчивостью к 4 и более антибиотикам. Их чувствительность к варнерину представлена в табл. 2.

Из 79 штаммов КНС, устойчивых к 4 антибиотикам, лишь 3 штамма (4%) оказались не чувствительны к изучаемому пептиду. Для 80,6% штаммов этой группы стафилококков МПК варнерина колебался от 8 до 64 мкг/мл, превышая МПК референс-штамма (0,25 мкг/мл).

Из 43 штаммов КНС, обладавших устойчивостью к пяти антибиотическим препаратам, лишь два штамма (4,6%) не проявили чувствительности к пептиду. Рост 85,6% штаммов этой группы подавлялся при тех же МПК пептида.

В группе КНС, устойчивых к 6 антибиотикам, варнерин не обладал антибактериальной активностью также лишь в отношении двух штаммов (7%). Чувствительность к пептиду при МПК 8-64 мкг/мл была характерна для 80,7% штаммов.

Устойчивость к варнерину возросла до 28,5% в группе КНС, не чувствительных к 7 антибиотикам. Для 80% штаммов этой группы МПК варнерина проявлялась в тех же пределах и лишь в группе стафилококков, устойчивых к 8 антибиотикам, варнерин в концентрации от 16 до 64 мкг/мл подавлял рост 75% штаммов.

Заключение

Таким образом, низкомолекулярный катионный пептид варнерин обладает высокой антибактериальной активностью в отношении полирезистентных штаммов КНС и может рассматриваться в качестве перспективного лечебного фактора для подавления антибиотикорезистентных штаммов коагулазонегативных стафилококков.

Таблица 1.

Распределение клинических штаммов КНС по чувствительности к антибактериальному пептиду варнерину

МПК, мкг/мл	Количество штаммов	% от общего числа
2	1	0,06
4	10	0,6
8	108	6,1
16	243	13,8
32	352	20,0
64	388	22,0
128	316	17,9
256	179	10,2
512	93	5,3
1024	48	2,7
2048	21	1,2
4096	1	0,06
Всего	1760	100

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vives E., Schmidt J., Pelegrin A.* Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V.1786. – P. 126–138.

2. *Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К.* Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Микробиология. – 2010. – Т. 79(2). – С. 228–238.

3. Методические указания МУК 4.2.1890-04 “Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам”.

4. *Коробов В.П., Титова А.В., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Панькова Н.В.* Зависимость антибактериального эффекта поликатионного пептида варнерина от энергетического состояния клетки-мишени // Микробиология. – 2005. – Т. 74(2). – С. 166–171.

Lemkina L.M.[1], Poludova T.V.[1], Korobov V.P.[1], Avdeeva N.S.[2]

INHIBITORY EFFECT OF WARNERIN ON CLINICAL STAPHYLOCOCCUS STRAINS WITH MULTIPLE RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

[1] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, l.lemkina@iegm.ru;

[2] Municipal Clinical Hospital No.7, Perm, Russia

Summary. Sensitivity of 1977 strains of clinical coagulase-negative staphylococci to warnerin was 89%. Of multiresistant (four to eight antibiotics) staphylococci, 80% of strains were inhibited in their growth at warnerin concentrations of 8-64 mg/ml.

Key words: coagulase-negative staphylococci, antibiotic-resistant, warnerin.

Таблица 2.

Чувствительность клинических полирезистентных штаммов КНС к антибактериальному пептиду варнерину.

Устойчивость к антибиотикам	Общее количество штаммов	Устойчивость к варнерину	МПК (мкг/мл) для чувствительных штаммов								
			4	8	16	32	64	128	256	512	1024
КНС, устойчивые к 4 антибиотикам	79	3	2	13	17	26	7	8	2	–	1
КНС, устойчивые к 5 антибиотикам	73	2	–	5	12	11	7	3	–	3	–
КНС, устойчивые к 6 антибиотикам	28	2	–	2	4	12	3	2	2	1	–
КНС, устойчивые к 7 антибиотикам	14	4	–	1	1	5	1	2	–	–	–
КНС, устойчивые к 8 антибиотикам	5	1	–	–	2	–	1	1	–	–	–

УДК 579.22

Лепехина Е.В., Смирнова Г.В.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕССОВ НА ДЕЙСТВИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI*

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, alenshick@mail.ru

Резюме. Исследовали рост и выживаемость бактерий *Escherichia coli*, мутантных по синтезу тиоловых редокс-систем, при комбинированном воздействии антибиотика ципрофлоксацина (ЦП) и экстремальных температур. Культивирование бактерий при 20 и 46ºС значительно повышало их устойчивость к действию антибиотика ципрофлоксацина (ЦП). Температурные стрессы в наибольшей степени модифицировали действие ЦП в штаммах *E. coli*, мутантных по синтезу глутатиона и тиоредоксина, и в наименьшей – у мутантов по тиоредоксинредуктазе. Результаты свидетельствуют о влиянии температурных стрессов на устойчивость бактерий к ципрофлоксацину и о существенной роли тиоловых редокс-систем в этих условиях.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, температурные стрессы, тиоловые редокс-системы.

Широкое распространение штаммов патогенных микроорганизмов, устойчивых к лечебным препаратам, привело к резкому снижению эффективности терапии инфекционных болезней. Это объясняет актуальность изучения генетических и биохимических механизмов антибиотикорезистентности, а также закономерностей ее формирования и распространения. Все большее внимание уделяется не только поиску новых антибактериальных веществ, но и исследованию условий, модифицирующих их действие [1]. В этой связи, представляют интерес исследования комбинированного воздействия антибиотиков и температурных стрессов на бактерии.

Ранее было показано, что в клетках бактерий *Escherichia coli*, подвергнутых воздействию температурных стрессов, наблюдается повышение активности генов и соответствующих ферментов, участвующих в адаптации к окислительному стрессу, как результата образования активных форм кислорода (АФК) [2]. С другой стороны, обработка антибиотиками, подавляющими трансляцию, индуцирует экспрессию генов холодового шока. Известно также, что внутриклеточные тиоловые редокс-системы могут играть важную роль в адаптации бактерий к стрессам [3].

Целью настоящей работы являлось изучение устойчивости бактерий *E. coli* к совместному действию температурных стрессов и ципрофлоксацина (ЦП) и роли тиоловых редокс-систем в этих условиях. Использовали следующие штаммы: RI89, wt; RI336, *gsh* (мутант по синтезу глутатиона); RI363, *trxA* (мутант по синтезу тиоредоксина А) и RI 319, *trxB* (мутант по синтезу тиоредоксинредуктазы).

Бактерии, находящиеся в экспоненциальной фазе аэробного роста, подвергали холодовому (37 → 20ºС) или тепловому шоку (37 → 42ºС или 37 → 46ºС) и через час после температурного стресса в культуру добавляли ЦП в концентрации 3 мкг/мл.

Эксперименты показали, что через час после добавлении антибиотика как при 37ºС, так и при 42ºС наблюдали снижение выживаемости клеток *E. coli* на два порядка. Спустя два часа после добавления ЦП выживаемость падала еще на порядок. Обработка клеток той же дозой ципрофлоксацина при температурах 20ºС и 46ºС вызывала снижение выживаемости у всех штаммов примерно в три раза. Спустя два часа после добавления ЦП, наблюдали падение выживаемости еще на 10%. Таким образом, культивирование бактерий при экстремальных температурах значительно повышало их устойчивость к действию антибиотика (таблица).

Таблица.

Выживаемость клеток *E. coli* RI89 при комбинированном стрессе

Температура	Контроль, %	Выживаемость через час после добавления ЦП, %	Выживаемость через два часа после добавления ЦП, %
20ºС	100	34.8	20.0
37ºС	100	1.3	0.15
42ºС	100	1.6	0.16
46ºС	100	33.2	18.5

Сравнение поведения различных штаммов показало, что температурные стрессы в наибольшей степени модифицировали действие ЦП в штаммах *E. coli*, мутантных по синтезу глутатиона и тиоредоксина, и в наименьшей – у мутантов по тиоредоксинредуктазе. В целом, проведенные исследования свидетельствуют о влиянии температурных стрессов на устойчивость бактерий к ципрофлоксацину и о существенной роли тиоловых редокс-систем в этих условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сидоренко С.В., Тишков В.И.* Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263-306.

2. *Смирнова Г.В., Закирова О.Н., Октябрьский О.Н.* Роль антиоксидантных систем в отклике бактерий *E. coli* на тепловой шок // Микробиология. – 2001. – Т.70. № 5. – С. 595-601.

3. *Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.* Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – С. 158-174.

Lepekhina E.V., Smirnova G.V.

INFLUENCE OF TEMPERATURE STRESSES ON THE CIPROFLOXACIN ACTION IN *ESCHERICHIA COLI*

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

Perm, Russia, alenshick@mail.ru

Summary. The cell growth and cell viability were investigated in bacteria *Escherichia coli*, which have mutations in thiol redox system synthesis, under the combined action of ciprofloxacin and extreme temperatures. The resistance of bacteria to antibiotic was greater under 20 and 46ºC. Temperature stresses modified ciprofloxacin action on *E. coli*, which have mutations in glutathione synthesis and thioredoxin synthesis, much more in comparison with thioredoxin reductase mutants. The results show the influence of temperature stresses on bacteria resistance to ciprofloxacin and the significant role of thiol redox systems under such condidtions.

Key words: temperature stresses, antibiotic resistance, thiol redox systems.

УДК 575.224.4

Магданова Л.А., Голясная Н.В.

МЕТАСТАБИЛЬНЫЙ МУТАТОРНЫЙ ФЕНОТИП В ПОПУЛЯЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, lakonic@rambler.ru, goljasnaja@mail.ru

Резюме. Исследовали популяцию *Pseudomonas aeruginosa*, обитающую в пределах системы плавательных бассейнов. Анализ структуры популяции показал значительное содержание бактерий с умеренным мутаторным фенотипом. Гипермутагенез в пределах субпопуляции бактерий – мутаторов имеет метастабильную природу: в благоприятных условиях частота мутаций в ряду поколений снижается. В то же время, в среде обитания мутаторный фенотип поддерживается длительное время, достаточное для возникновения ряда мутационных изменений в нуклеотидной последовательности гена 16s рРНК. Анализ последовательностей генов ММР установил наличие различий в структуре *mutS* и *mutL* мутаторных и немутаторных штаммов. Обнаруженные вариации связаны с легко ревертирующими хромо-

сомными перестройками. Результаты позволяют предположить, что причиной возникновения многочисленной субпопуляции мутаторов *P. aeruginosa* является активность механизма адаптивного мутагенеза по типу «амплификация – мутагенез».

Ключевые слова: мутаторный фенотип, ММР, изменчивость популяции, гипермутагенез.

Введение

Мутационный процесс является важным фактором развития устойчивости микроорганизмов к разнообразным антибиотикам и биоцидам. Стрессовые условия приводят к активации в бактериях механизмов регуляции интенсивности мутагенеза, действующих как на клеточном, так и на популяционном уровне [1]. Исследование способов модуляции активности мутационного процесса необходимо в контексте изучения систем адаптации бактерий, препятствующих лечению инфекций, а также санации промышленных помещений и оборудования. Кроме того, знание особенностей формирования, развития и регуляции мутаторного фенотипа имеет значение в контексте изучения законов экологии и эволюции. В настоящей работе произведён анализ популяции *Pseudomonas aeruginosa*, персистирующей в пределах системы плавательных бассейнов.

Материалы и методы исследования

Отбор образцов производили в пределах одного водно-инженерного сооружения, включающего три плавательных бассейна и их системы очистки. Скрининг частоты мутантов и активности биопленкообразования изолятов осуществляли флуктуационным (на агаризованной среде с рифампицином) и колориметрическим методами соответственно. Для дополнительного исследования характера дифференциации популяции *P. aeruginosa* производили оценку таких параметров, как скорость роста, подвижность роения, чувствительность к пероксиду водорода и продукция рамнолипидов. С целью установить причины формирования мутаторного фенотипа субпопуляции умеренных мутаторов *P. aeruginosa* осуществляли амплификацию и секвенирование генов репарации неправильно спаренных оснований (ММР). Для этого использовали как ранее опубликованные [2], так и специально подобранные праймеры, фланкирующие различные фрагменты генов *mutS* и *mutL P. aeruginosa*. Все эксперименты проводили в трех и более повторностях, результаты подвергали обработке с использованием методов базовой и непараметрической (критерий Манна-Уитни, метод ранговой корреляции Спирмена) статистики. В качестве контрольного использовали музейный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Результаты и обсуждение

Результаты настоящей работы позволили описать структуру популяции *P. aeruginosa* по признаку частоты мутантов. Установлено содержание в популяции 15% клеток, отличающихся повышенной интенсивностью спонтанного мутагенеза, а также сниженной способностью к биопленкообразованию, высокой чувствительностью к действию пероксида водорода, морфологией колоний и, в конечном счете, последовательностью нуклеотидов гена 16S рРНК. Фенотипические особенности представителей этой субпопуляции бактерий сглаживались после ряда (4–5) пересевов. В жидкой питательной среде происходит реверсия к фенотипу дикого типа с понижением частоты мутантов, однако, вероятно, в природе, при сохранении селективного давления стрессовых факторов, характерных для исходной среды обитания бактерий, мутаторный фенотип поддерживается достаточно долго. В частности, это подтверждается приобретением различий последовательностей гена 16s рРНК представителей субпопуляций *P. aeruginosa* с мутаторным фенотипом и штаммов дикого типа.

Повреждения генов ММР являются наиболее часто встречающимися факторами, обуславливающими формирование мутаторного фенотипа [1]. Поэтому для анализа причин вариаций частоты мутагенеза в популяции *P. aeruginosa* проводили исследование нуклеотидных последовательностей генов *mutSL* представителей а) субпопуляции штаммов – мутаторов, б) изогенных бактерий дикого типа и в) музейного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853. Результаты показывают, что, вне зависимости от того, какой набор праймеров использовали для ПЦР различных участков генов *mutSL*, длины амплифицируемых последовательностей ДНК в случае бактерий с мутаторным фенотипом и фенотипом дикого типа значительно различались. При этом секвенирование полученных фрагментов подтвердило, что происходила амплификация именно *mutSL*.

Заключение

Таким образом, признаки, характеризующие субпопуляцию штаммов с мутаторным фенотипом, являются временными в ряду поколений, в то же время затрагивают структуру ДНК. Полученные результаты исследования позволяют предположить, что гены *mutSL* в клетках изолятов субпопуляции бактерий с мутаторным фенотипом подвергаются процессу адаптивного мутагенеза по модели «амплификация – мутагенез» [3]. Предполагаемый механизм формирует метастабильный мутаторный фенотип, промежуточный между временным (проявляющимся только в условиях стресса) и наследственным (возникающим вследствие мутаций в генах, контролирующих стабильность ДНК). Вероятно, гипермутагенез данного типа обеспечивает значительный вклад в изменчивость бактериальной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Friedberg E.C. Walker G.S., Siede W.* DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C.: ASM Press. – 1995. – 698 p.

2. *Ciofu O., Mandsberg L.F., Bjarnsholt T., Wassermann T., Hóiby N.* Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants // Microbiology. – 2010. – V. 156. – P. 1108–1119.

3. *Hendrickson H., Slechta E.S., Bergthorsson U., Andersson D.I., Roth J.R.* Amplification–mutagenesis: Evidence that "directed" adaptive mutation and general hypermutability result from growth with a selected gene amplification // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. N. 4. – P. 2164–2169.

Magdanova L.A., Golyasnaya N.V.

METASTABLE MUTATOR PHENOTYPE IN THE POPULATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS,

Perm, Russia, lakonic@rambler.ru, goljasnaja@mail.ru

Summary. This research dealt with a *Pseudiomonas aeruginoisa* population of swimming pools. In the study on the structure of *P. eruginosa* population, high percentage of moderate mutators was present. Their hypermutagenesis is metastable and rapidly becomes weaker during cultivation on rich media. However, by its nature, this mutator phenotype is more persistent. Thus, in our work, the mutator of *P. aeruginosa* demonstrated some base changes in their 16s rRNA nucleotide sequences. Analysis of MMR genes showed some reversible chromosome aberrations in mutator genomes. Our results give evidence of amplification – mutagenesis mechanism action. We propose that directed adaptive mutagenesis in *mutSL* produces this metastable mutator phenotype.

Key words: mutator phenotype, MMR, population variability, hypermutagenesis.

УДК 579.25

Максимова А.В.[1], Павлова Ю.А.[2], Кузнецова М.В.[2], Максимов А.Ю.[1,2], Демаков В.А.[1,2]

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АЛЬДОКСИМДЕГИДРАТАЗЫ НИТРИЛУТИЛИЗИРУЮЩИХ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, nuta-max@ya.ru, mar@iegm.ru

Резюме. Проведена детекция генов альдоксимдегидратаз у нитрилутилизирующих почвенных бактерий. Установлено, что в геноме 7-ми штаммов грамотрицательных бактерий (6 – *Variovorax* spp., 1 – *Pseudomonas fluorescens* 3220) и 13-ти грамположительных (12 – *Rhodococcus erythropolis*, 1 – *Rhodococcus rhodochrous*) присутствовали фрагменты ДНК, соответствующие по размеру генам *oxd*. Сравнение нуклеотидных последовательностей *oxd* трех изолятов родококков, принадлежащих к разным геномогруппам, выявило высокий уровень сходства (94-96%) участков генов длиной 674-694 п.н. с генами *oxd* референтных штаммов *Rhodococcus globerulus* A4 (GenBank AB105912.1)

и *Rhodococcus erythropolis* (GenBank AM946017.1).

Ключевые слова: альдоксимы, альдоксимдегидратазы, нитрилутилизирующие бактерии.

Введение

Биогенные альдоксимы известны среди интермедиатов биосинтеза некоторых биологически активных веществ, таких как ауксин и цианогликозиды растений [1]. У бактерий конверсия альдоксимов в нитрилы, а затем в соответствующие карбоновые кислоты происходит путем сочетания работы ферментов альдоксимдегидратазы (EC 4.99.1.5; EC 4.99.1.7) и нитрилтрансформирующих ферментов – нитрилгидратазы и амидазы и/или нитрилазы [2]. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов альдоксимдегидратаз из штаммов разных видов бактерий показало, что сходство между *oxd Rhodococcus* sp. N-771 и гомологичными генами *R. globerulus* A-4, *Pseudomonas chlororaphis* B23, *Bacillus* sp. OxB-1 составило 96,3, 77,6, 30,4% соответственно [3]. Работа посвящена детекции и характеристике генов альдоксимдегидратаз почвенных бактерий, обладающих альдоксим-нитрильным путем метаболизма.

Материалы и методы исследования

В анализе использовали 138 штаммов бактерий, в том числе 47 – выделенных на ацетальдоксиме, 91 – на ацето- и изобутиронитриле, изолированных ранее из образцов почв и вод естественной среды и почвы промышленных предприятий. Детекцию генов альдоксимдегидратаз осуществляли посредством ПЦР с праймерами к полным генам, кодирующим известные альдоксимдегидратазы грамотрицательных (*P. chlororaphis* B23, GenBank №AB093544) и грамположительных (*R. erythropolis*, GenBank №AB094201) микроорганизмов. Секвенирование генов проводили с применением набора реактивов SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе MegaBase1000 (JSC GE Healthcare, США). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли, используя программы BLAST и базы данных GenBank/EMBL/DDBJ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Результаты и обсуждение

На матрице ДНК 7 штаммов грамотрицательных бактерий (6 – *Variovorax* spp; 1 – *P. fluorescens* 3220) с праймерами PsOxd1/2 детектированы фрагменты, соответствующие по размеру гену альдоксимдегидратазы (1058 п.н.). У 13 штаммов грамположительных бактерий (12 – *R. erythropolis*, 1 – *R. rhodochrous* K17P) амплифицированы фрагменты ДНК с праймерами RhOxd1/2 размером около 1069 п.н. (рисунок). Нужно подчеркнуть, что в большинстве случаев гены альдоксимдегидратазы были детектированы в штаммах, содержащих весь комплекс генов, кодирующих ферменты гидролиза нитрилов: нитрилгидратазу/амидазу и/или нитрилазу. В ряде случаев детектировали ген альдоксимдегидратазы и один из генов, ответственных за синтез гидролитических ферментов.

Установлено, что секвенированные фрагменты ДНК трех штаммов *R. rhodochrous* K17P, *R. erythropolis* 2-4 и 4-1 совпадают с известными последовательностями генов альдоксимдегидратаз *Rhodococcus globerulus* (GenBank AB105912) и *R. erythropolis* (GenBank AM946017.1). Идентичность нуклеотидных последовательностей генов *oxd* штаммов K17P, 2-4 и 4-1 составила 94-96% (таблица). Выявленные аминокислотные замены расположены вне консервативных областей альдоксимдегидратаз из разных бактериальных культур. Замена Arg61Gln, выявленная у двух штаммов родококков, встречается и у других бактерий, в том числе *Rhodococcus* sp. N-771 и *P. chlororaphis* B23. Аминокислотный остаток Ala-110 описан у *Bacillus sp*. OxB-1 [3].

Таблица.

Анализ нуклеотидной последовательности фрагментов генов *oxd R. rhodochrous* K17P, *R. erythropolis* 2-4 и 4-1

Номер штамма	Размер секвенированного фрагмента, п.н. (расположение на гене oxd *R. globerulus* A4		Сходство нуклеотидных последовательностей с *R. globerulus* A4, %	Аминокислотные замены
2-4	67 4	С 63 п.н. по 736 п.н.	94	R61Q T110A
4-1	69 4	С 56 п.н. по 749 п.н.	95	R61Q T110A S191R
K17P	69 0	С 60 п.н. по 749 п.н.	96	–

Работа выполнена при поддержке грантов Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2011 гг.)», проект № 2.1.1/12133.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sibbesen O., Koch B., Rouze P*. Biosynthesis of cyanogenic glucosides. Elucidation of the pathway and characterization of the cytochrome P-450 involved in amino acids and their derivatives in higher plants // Wallsgrove R.M. (ed.). Cambridge: University Press. – 1995. – P. 227–241.

2. *Kato Y., Ooi R., Asano Y*. Distribution of aldoxime dehydratase in microorganisms // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 2290–2296.

3. *Kato Y., Satoshi Y., Sheng-Xue X., Asano Y*. Aldoxime dehydratase co-existing with nitrile hydratase and amidase in the iron-type nitrile hydratase-producer *Rhodococcus* sp. N-771 // J. Biosci. Bioeng. – 2004. – V. 97. – P. 250–259.

Maksimova A.V.[1], Pavlova Yu.A.[2], Kuznetsova M.V.[2], Maksimov A.Yu.[1,2]

DESCRIPTION OF ALDOXIME DEHYDRATASE GENES FROM NITRILE-DEGRADING BACTERIA

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia;

[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, nuta-max@ya.ru

Summary. Aldoxime dehydratase-encoding genes (*oxd*) were detected in nitrile-degrading microorganisms isolated from soil samples. In this study, DNA fragments corresponding in size to *oxd* genes were found in genomes of seven gram-negative (*Variovorax* spp. - 6; *P. fluorescens* 3220 - 1) and 13 gram-positive (*R. erythropolis* - 12, *R. rhodochrous* - 1) bacteria. Comparison of *oxd* nucleotide sequences from three different rhodococcal strains showed a high level of similarity (94-96%) of gene regions of 674-690 bp to *oxd* genes of reference strains *Rhodococcus globerulus* A4 (GenBank AB105912.1) and *Rhodococcus erythropolis* (GenBank AM946017.1).

Key words: aldoximes, aldoxime dehydratase, nitrile-degrading microorganisms.

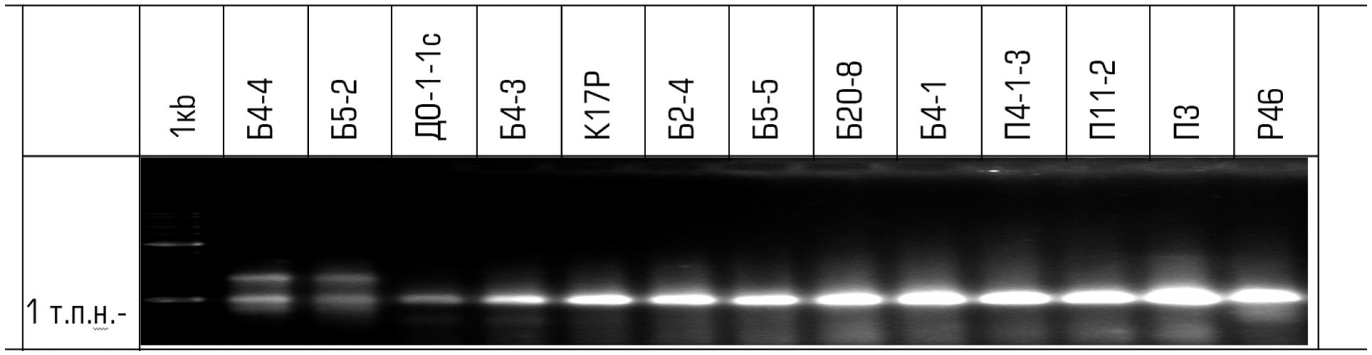


Рисунок. Электрофорез ПЦР-продуктов, соответствующих генам альдоксимдегидратаз грамположительных бактерий.

УДК 579.23; 579.22

Митько В.Е., Гарусов А.В., Ильинская О.Н., Маргулис А.Б.

ПРОИЗВОДНЫЕ ФУРАНОНОВ КАК ИНГИБИТОРЫ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ У БАКТЕРИЙ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, anna.margulis@ksu.ru

Резюме. В работе оценены различия в скорости пигментообразования у *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии фуранонов, охарактеризовано изменение антибиотической активности выделенного штамма *Streptomyces* по отношению к *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* и изменение антибиотикорезистентности последних при действии исследуемых соединений.

Ключевые слова: производные фуранонов, Quorum-sensing, пигментообразование, чувствительность к антибиотику.

Введение

Одной из важнейших проблем современной микробиологии и медицины является все большее распространение бактериальных возбудителей, устойчивых к традиционным лекарственным препаратам. Особенно ярко эта проблема иллюстрируется широким распространением внутрибольничных инфекций, которые регистрируются в отделениях интенсивной терапии более чем у 20% пациентов. Распространение устойчивых к лекарственным препаратам форм патогенных бактерий, снижающее эффективность и обесценивающее все большее количество обычно применяемых традиционных лекарственных средств, и необходимость разработки способов подавления образования бактериями биоплёнок ставят вопрос о новых стратегиях борьбы с инфекционными заболеваниями, о создании лекарственных средств нового поколения, воздействующих на специфические биохимические системы микроорганизмов. В настоящее время принято считать, что одной из наиболее перспективных «мишеней» подобного рода является QS (quorum-sensing) – регуляция: QS-системы участвуют в регуляции вирулентности бактерий и формировании ими биопленок [1]. Подавление функционирования QS-систем регуляции может быть достигнуто при помощи антагонистов аутоиндукторов, которые мешают связыванию аутоиндуктора с молекулами рецепторных белков. Все больше внимания уделяется природным антагонистам аутоиндукторов QS, производным фуранонов. Целью нашей работы было оценить влияние серосодержащих производных фуранонов на плотностно-зависимые процессы у бактерий (пигментообразование, антибиотикообразование, антибиотико-резистентность).

Материалы и методы исследования

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Serratia marcescens*, *Micrococcus lysodeicticus*, *Actinomyces sp*. и *Salmonella typhimurium* TA 100 (для теста Эймса). Исследовали серосодержащие производные фуранонов (рис. 1), которые были синтезированы на кафедре органической химии КФУ под руководством к.х.н., доцента Курбангалиевой А.Р.

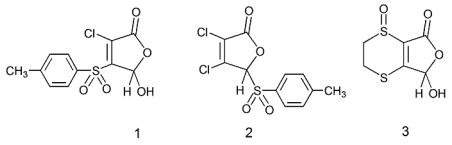


Рис. 1. Формулы серосодержащих производных фуранонов:
1) 5-гидрокси-4-(4-метилфенилсульфонил)-3-хлор-2(5Н)-фуранон;
2) 5-(4-метилфенилсульфонил)-3,4-дихлор-2(5Н)-фуранон;
3) 7-гидрокси-2,3-дигидро-[1,4]дитиино[2,3-с]-5(7Н)-фуранона 4-оксид).

Результаты и обсуждение

В первую очередь необходимо было определить токсические и мутагенные эффекты серосодержащих производных фуранонов. В ходе работы было установлено, что исследуемые серосодержащие производные фуранонов не проявили токсических эффектов в отношении бактериальных клеток в концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл. В классическом тесте [2] исследуемые соединения не проявили мутагенных эффектов в концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл, за исключением фуранона №1 в концентрации 10 мкг/мл. Он был выбран в качестве исследуемого объекта в последующих экспериментах.

Далее мы планировали оценить различия в скорости пигментообразования у *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии фуранонов, охарактеризовать изменение антибиотической активности выделенного штамма *Streptomyces* по отношению к *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии исследуемых соединений и оценить изменение антибиотикорезистентности *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии фуранонов. В экспериментах на определение пигментообразования было показано, что, не оказывая токсического воздействия на клетки *Serratia marcescens,* исследуемый фуранон №1 в концентрациях 1 и 10 мкг/мл способен подавлять образование пигмента.

Для *Micrococcus lysodeicticus* и *Streptomyces sp*. не было обнаружено снижения способности к образованию пигментов. При определении образования антибиотика было установлено, что у данного *Streptomyces sp*. оно начинается к 6-м суткам. Наибольшую чувствительность к антибиотику к 7-м суткам проявляют клетки *Micrococcus lysodeicticus* в контрольном образце. Клетки *Micrococcus lysodeicticus* более чувствительны к вырабатываемому антибиотику по сравнению с *Serratia marcescens*. Клетки *Serratia marcescens*, обработанные фуранoном, не чувствительны к синтезируемому стрептомицетом антибиотику. Тот же эффект наблюдается и для микрококка, но на более ранних сроках (к 7-м суткам роста стрептомицета), а к 9-м суткам чувствительность к антибиотику клеток *Micrococcus lysodeicticus,* обработанных фуранoном, увеличивается.

Авторы выражают глубокую благодарность к.х.н., доценту кафедры органической химии КФУ Курбангалиевой А.Р. за синтез фуранонов и их производных и участие в обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № 14.740.11.1040 от 23 мая 2011).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Suga H., Smith K.* Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target // Current Opinion in Chemical Biology. – 2003. – V. 7. – P. 586–591.

2. *Ильинская О.Н., Маргулис А.Б.* Краткосрочные тест-системы для определения генотоксичности // Методическое руководство. – Казань: КГУ, 2005. – 31с.

Mit'ko V.E., Garusov A.V., Ilinskaya O.N., Margulis A.B.

FURANONE DERIVATIVES AS INHIBITORS OF QUORUM-SENSING IN BACTERIA

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia, anna.margulis@ksu.ru

Summary. We evaluated the differences in the rate of pigment formation in *Micrococcus lysodeicticus* and *Serratia marcescens* by the action of furanones, characterized by changes in antibiotic activity of the selected strain of *Streptomyces* towards *Micrococcus lysodeicticus* and *Serratia marcescens*, and variation in antibiotic resistance in the last under action of the compounds.

Key words: furanones derivatives, Quorum-sensing, pigment formation, sensitivity to the antibiotics.

УДК 579.873.13:577.152.3

Морозова А.Н., Головнева Н.А.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ НА β-ГАЛАКТОЗИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь, biochem_lab@mbio.bas-net.by

Резюме. Для определения активности и выделения внутриклеточной β-галактозидазы протестировано влияние химических реагентов и методов дезинтеграции клеток бифидобактерий. Показана эффективность неионного детергента тритон Х-100 для определения активности внутриклеточной β-галактозидазы бифидобактерий.

Ключевые слова: β-галактозидаза, бифидобактерии, *Bifidobacterium adolescentis*.

Введение

Бифидобактерии синтезируют широкий спектр ферментов, участвующих в расщеплении сложных углеводов, которые впоследствии распадаются на низкомолекулярные олигосахариды либо моносахариды с участием гидролаз. β-галактозидаза (β-D-галактозидгалактогидролаза, EC 3.2.1.23) – фермент класса гидролаз, катализирующих ферментативный распад сложных олиго- и полисахаридов до моносахаридов, которые затем преобразуются в промежуточные соединения фруктозо-6-фосфатного ферментативного пути. Известна также способность β-галактозидаз бифидобактерий синтезировать биологически активные галактоолигосахариды в реакции трансгликозилирования. Проявление гидролитического и трансгликозилирующего действия β-галактозидаз бифидобактерий усиливают огромный потенциал полезных свойств симбионтной микрофлоры для поддержания и коррекции здоровья людей. β-галактозидазы бифидобактерий имеют различную локализацию (внеклеточные и внутриклеточные ферменты) и сложный изоферментный состав, что является следствием адаптации этих микроорганизмов к занимаемой экологической нише [1]. Внутриклеточные β-галактозидазы воздействуют на олигосахариды, которые поступают в клетку при помощи специфических транспортеров [2]. Импорт углеводов, как и непосредственно их потребление, специфично для различных штаммов бифидобактерий. В предыдущих исследованиях обнаружено, что бифидобактерии, в основном, продуцируют внутриклеточные β-галактозидазы, прочно связанные с клеточными структурами. Для характеристики продукции фермента важно разработать адекватный метод определения активности внутриклеточной β-галактозидазы и установить способ дезинтеграции клеток, позволяющий выделить фермент в активной форме.

Целью данной работы явилось исследование эффективности различных методов дезинтеграции клеток бифидобактерий для выявления внутриклеточной ферментативной активности.

Материалы и методы исследования

Активность β-галактозидазы определяли колориметрически по количеству освободившегося о-нитрофенола из о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида и рассчитывали в единицах Миллера [3]. Для определения внутриклеточной β-галактозидазной активности в эксперименте использовали дезинтеграцию клеток ультразвуком, обработку лизоцимом, детергентами. Ультразвуковую дезинтеграцию проводили в течение 3-10 минут при 44 кГц, лизоцим (Fluka) использовали в концентрации 10мг/мл, тритон Х-100 – 1%, меркаптоэтанол – 6мкл/мл. После обработки клеток проводили центрифугирование (10 000 g, 10 мин. при 4°С), активность фермента определяли в супернатанте.

В эксперименте использовали клетки экспоненциальной фазы развития, проявляющие максимальную гидролитическую активность β-галактозидазы, выращенные на среде MRS с лактозой. Контролем служила активность ферментов нативных клеток бифидобактерий, отмытых от остатков питательной среды.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования активности фермента в полученных фракциях представлены на рисунке.

Изменение проницаемости клеточной поверхности под действием детергента приводит к тому, что низкомолекулярные субстраты или продукты свободно проникают или выходят из клетки. Такой подход широко используется для исследования кинетических параметров внутриклеточных ферментов бактерий. Обработка тритоном Х-100 клеток бифидобактерий приводит к увеличению в супернатантах активности β-галактозидазы в 10 раз, а удельной активности – в 36 раз. При добавлении лизоцима активность β-галактозидазы увеличивается в 4,5 и 6,3 раза, соответственно (рисунок). Установлено, что в надосадке гомогената, полученного при ультразвуковой дезинтеграции клеток *B. adolescentis* Cf-G активность фермента в 28, по удельной активности – в 46 раз выше, чем в интактных клетках. Меркаптоэтанол незначительно изменяет гидролитическую активность фермента. Установлено, что тритон Х-100 не оказывает влияния на гидролитическую активность очищенного фермента. Следует отметить, что удельная активность β-галактозидазы после обработки бифидобактерий детергентом сравнима с активностью надосадочной фракции гомогената клеток.

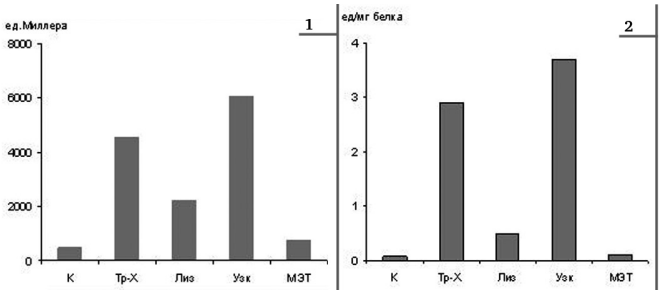


Рисунок. Активность β-галактозидазы *Bifidobacteriam adolescentis* Cf-G (1 – ед. Миллера, 2 – ед/мг белка) в зависимости от метода дезинтеграции клеток (К – контроль; Тр-Х – тритон Х-100, Лиз – лизоцим, Узк – ультразвук, МЭТ – меркаптоэтанол).

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что максимальная активность β-галактозидазы обнаружена при разрушении клеток бифидобактерий ультразвуком Данный способ дезинтеграция клеток является оптимальным для процедуры выделения и очистки фермента. Использование неионного детергента тритон Х-100 в составе инкубационной смеси позволяет оценить активность внутриклеточной β-галактозидазы бифидобактерий, не прибегая к сложной процедуре дезинтеграции и последовательного центрифугирования клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Moller P.L., Jorgensen F., Hansen O.C., Madsen S.M., Stougaard P.* Intra- and extracellular β-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* и *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. N. 5. – P. 2276–2283.

2. *Parche S., Amon J., Jankovic I., Rezzonico E., Beleut M., Barutзи H., P. Eddy M., Burkovski A., Arigoni F., Titgemeyer F.* Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705 // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – N.12. – P. 9–19.

3. *Miller J.H.* A short course in bacterial genetics. Plainview. – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

Morozova A.N., Golovneva N.A.

THE EFFECT OF DIFFERENT DISINTEGRATION METHODS ON β-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIA

Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, biochem_lab@mbio.bas-net.by

Summary. Different chemical and physical disintegration methods were used to promote recovery of β-galactosidase from bifidobacterial cells and determination of intracellular enzyme activity. High efficiency of non-ionic detergent Triton X-100 as cell permeabilising agent was applied for intracellular β-galactosidase activity assays.

Key words: β-Galactosidase, bifidobacteria, *Bifidobacterium adolescentis.*

УДК 579.25 – 57.063.8

Новоселова Н.Н.[1], Ананьина Л.Н.[2], Куюкина М.С.[1,2], Ившина И.Б.[1,2]

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ РЕВИЗИЯ КУЛЬТУР АКТИНОБАКТЕРИЙ, ПОДДЕРЖИВАЕМЫХ В РЕГИОНАЛЬНОЙ ПРОФИЛИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ АЛКАНОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ 16S рРНК-ГЕНА

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, nataniika@yandex.ru

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, ivshina@iegm.ru

Резюме. По результатам сравнительного анализа секвенированных последовательностей 16S рРНК-гена проведена таксономическая ревизия генофонда Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, www.iegm.ru/iegmcol). Подтверждена аутентичность поддерживаемых типовых штаммов видов *Dietzia maris, Gordonia rubripertincta, G. terrae, Rhodococcus coprophilus, R. erythropolis, R. globerulus, R. opacus, R. rhodnii, R. rhodochrous* и *R. ruber*. Идентифицированы ранее не определенные до вида коллекционные культуры актинобактерий, отнесенные на основании полной гомологии 16S рРНК-гена к представителям *G. alkanivoranus, G. amicalis* и *R. qingshengii*. Результаты геносистематического исследования согласуются с данными фенотипического, хемотаксономического и иммунохимического анализа.

Ключевые слова: актинобактерии, бактериальная таксономия, 16S рРНК, секвенирование.

Введение

Богатейшими ресурсами для биотехнологии являются микробные коллекции. В настоящее время во многих странах мира наблюдается период подъема коллекционного дела. Предпочтение отдается формированию специализированных коллекций, взаимодействующих по единым правилам и отвечающим потребностям пользователей, созданию широкой сети децентрализованных коллекций микробных культур. Одной из специализированных ячеек интенсивно развивающейся сети микробных коллекций является созданная в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, WDCM #768). Коллекция ориентирована на интересы биотехнологии и специализируется на поддержании микроорганизмов, ведущих окисление природных и антропогенных углеводородов и таким образом участвующих в биогеохимических процессах биосферы. Объем генофонда составляет 2000 бактериальных штаммов, принадлежащих к родам *Corynebacterium, Dietzia, Gordonia, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus*, имеющих значительный потенциал для промышленной эксплуатации [1]. Применение в коллекционной работе наиболее адекватного метода современной бактериальной таксономии – анализа последовательностей гена 16S рРНК, наряду с результатами фенотипического, хемотаксономического и иммунохимического анализа, способствует экспрессной и точной идентификации свежевыделенных культур и уточнению систематического положения поступающих в коллекцию штаммов актинобактерий.

Цель настоящей работы – таксономическая ревизия культур актинобактерий, поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов, на основе анализа последовательностей 16S рРНК-гена.

Материалы и методы исследования

В работе использовали коллекционные культуры актинобактерий, принадлежащие к видам *Dietzia maris* (1 штамм), *Gordonia rubripertincta* (2 штамма), *G. terrae* (1 штамм), *Rhodococcus coprophilus* (1 штамм), *R. erythropolis* (5 штаммов), *R. fascians* (1 штамм), *R. globerulus* (1 штамм), *R. opacus* (1 штамм), R. rhodnii (1 штамм), «*R. longus*» (9 штаммов), *R. rhodochrous* (1 штамм), *R. ruber* (13 штаммов), *Gordonia* sp. (2 штамма) и *Rhodococcus* sp. (1 штамм). Бактериальную ДНК выделяли путем суспендирования единичной выросшей на МПА колонии в 0,05М NaOH и последующих трех циклов замораживания–оттаивания. ПЦР проводили с праймерами 27f и 1492r в ДНК–амплификаторе MyCycler («BioRad», США). Реакционная смесь объемом 25 мкл состояла из 1х буфера для *Taq*-ДНК полимеразы, 0,2 мМ дНТФ, 2,5 мМ MgCl2, 0,2 мкМ каждого праймера, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК полимеразы («Синтол», Россия), 2 мкл супернатанта лизата. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 0,8% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Визуализицию и документирование гелей проводили в проходящем УФ-свете системой GelDoc

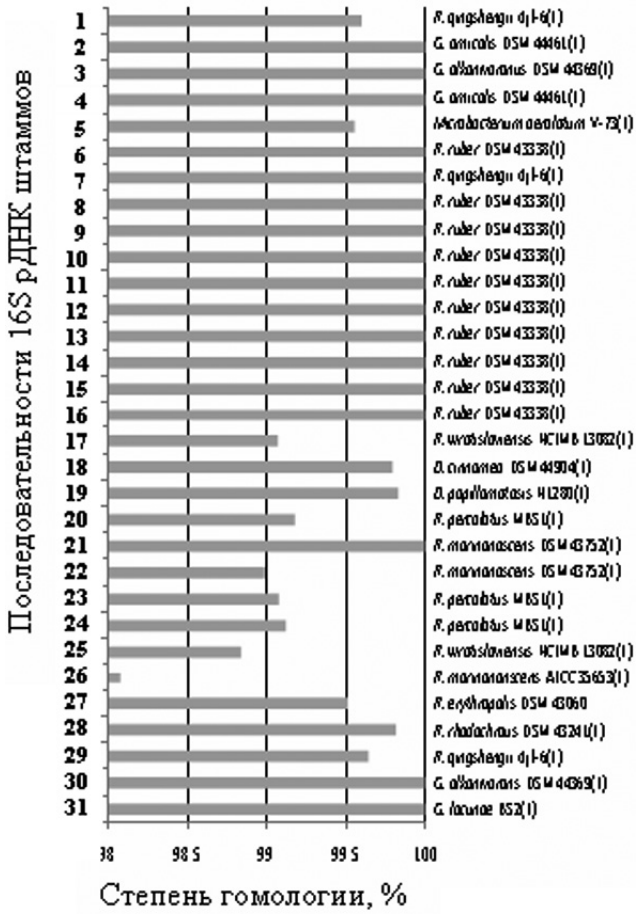


Рисунок. Степень гомологии последовательностей 16S рРНК-гена исследуемых культур с соответствующими последовательностями типовых штаммов валидных видов актинобактерий, депонированных в публичных базах.

Приведены условные номера исследуемых штаммов (в скобках указан коллекционный номер): 1 (ИЭГМ 746) – *Rhodococcus* sp.; 2 (ИЭГМ 768), 3 (ИЭГМ 748), 4 (ИЭГМ 747) – *Gordonia* sp.; 5 (ИЭГМ 448), 6 (ИЭГМ 76), 7 (ИЭГМ 345), 8 (ИЭГМ 83), 9 (ИЭГМ 78), 10 (ИЭГМ 75), 11 (ИЭГМ 74), 12 (ИЭГМ 73), 13 (ИЭГМ 72), 14 (ИЭГМ 369), 15 (ИЭГМ 330), 16 (ИЭГМ 71) – *R. ruber*; 17 (ИЭГМ 589), 18 (ИЭГМ 68), 19 (ИЭГМ 63), 20 (ИЭГМ 33), 21 (ИЭГМ 32), 22 (ИЭГМ 31), 23 (ИЭГМ 30), 24 (ИЭГМ 28), 25 (ИЭГМ 27), 26 (ИЭГМ 43) – «*R. longus*»; 27 (ИЭГМ 43) – *R. facians*; 28 (ИЭГМ 179), 29 (ИЭГМ 766), 30 (ИЭГМ 247), 31 (ИЭГМ 95) – *G. rubripertincta*.

(«Bio-Rad», США). Секвенирование полученных ампликонов осуществляли на базе Научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии и генетики Естественно-научного института при Пермском государственном национальном исследовательском университете. Секвенирование проводили с помощью коммерческого набора Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v 3.1 («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США), следуя инструкциям фирмы-производителя. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей 16S рДНК исследуемых культур с депонированными в публичных базах последовательностями типовых штаммов валидных видов актинобактерий проводили с помощью пакета программ EzTaxon server 2.1 [3].

Результаты и обсуждения

В результате исследования подтверждена аутентичность поддерживаемых в коллекции типовых штаммов *Dietzia maris* ИЭГМ 55Т, *Gordonia rubripertincta* ИЭГМ 95Т, *G. terrae* ИЭГМ 143Т, *Rhodococcus coprophilus* ИЭГМ 600Т *R. erythropolis* ИЭГМ 7Т, *R. globerulus* ИЭГМ 591Т, *R. opacus* ИЭГМ 716Т, *R. rhodnii* ИЭГМ 555Т, *R. rhodochrous* ИЭГМ 62Т, *R. ruber* ИЭГМ 70Т, для которых установлено 100%-ное сходство секвенированных ампликонов с опубликованными фрагментами 16S рРНК-гена типовых штаммов данных видов актинобактерий. По результатам генетического анализа подтверждена таксономическая принадлежность 10 коллекционных штаммов *R. ruber*, выделяющихся среди представителей данного вида по морфо-физиологическим (желто-оранжевая пигментация колоний и чувствительность к антибиотикам) и хемотаксономическим (жирнокислотный состав клеточных липидов) признакам. Как видно из рисунка, исследуемые культуры демонстрируют полную гомологию 16S рРНК-гена с соответствующей последовательностью *R. ruber* DSM 43338T.

На основании сравнительного анализа фрагментов 16S рРНК-гена пересмотрено таксономическое положение коллекционных культур *R. ruber* ИЭГМ 345, *R. erythropolis* ИЭГМ 247 и *G. rubripertincta* ИЭГМ 95, для которых обнаружено полное сходство нуклеотидных последовательностей с таковыми типовых штаммов R. *qingshengii* djl-6T, *R. marinonanscens* ATCC 35653T и *G. alkanivorans* DSM 44369T соответственно. Кроме того, по данным генетического анализа исследуемые представители невалидного вида «*R. longus*» предварительно отнесены к таксонам *R. wratislaviensis, R. marinonanscens, R. percolatus*, *D. cinnamea* и *G. lacunae*. Не определенные ранее до вида свежевыделенные культуры *Gordonia sp*. ИЭГМ 748, ИЭГМ 768 и *Rhodococcus* sp. ИЭГМ 746 по данным гомологии 16S рРНК-гена идентифицированы как *G. amicalis, G. alkanivoranus* и *R. qingshengii* соответственно (см. рисунок). Результаты предварительной видовой идентификации бактериальных изолятов полностью подтверждаются данными полифазной таксономии с использованием фенотипического, хемотаксономического и иммунохимического анализа.

Выводы

В результате проведенных исследований осуществлена таксономическая ревизия отдельных коллекционных культур из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ. Подтверждена аутентичность поддерживаемых типовых штаммов видов *Dietzia maris, Gordonia rubripertincta, G. terrae, Rhodococcus coprophilus, R. erythropolis, R. globerulus, R. opacus, R. rhodnii, R. rhodochrous* и *R. ruber*. Коллекционные культуры актинобактерий, ранее не определенные до вида, на основании данных фенотипического, хемотаксономического, иммунохимического анализа, а также полной гомологии 16S рРНК-гена отнесены к представителям *G. alkanivoranus, G. amicalis* и *R. qingshengii*.

Работа поддержана грантами Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-64403.2010.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (номер гос. регистрации 01200963679), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (государственный контракт № 16.518.11.7069), Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (государственный контракт № 16.M04.12.0025) и "FP7 Cooperation Work Programme: Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnologies", Proposal No 266106 «BRIO».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ившина И.Б., Каменских Т.Н., Куюкина М.С., Рычкова М.И., Шадрин О.А., Рыбалка Л.В., Зверева Л.В., Чумаков О.Б.* Методы консервации культур *Rhodococcus* spp. и их применение в практике поддержания специализированного фонда алканотрофных родококков // Микробиология. – 1994. – Т. 63. Вып. 1. – С. 118–128.

2. *Bell K.S., Kuyukina M.S., Heidbrink S., Philp J.C., Aw D.W.J., Ivshina I.B., Christofi N*. Identification and environmental detection of Rhodococcus species by 16S rDNA-targeted PCR // J. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 87. – P. 472–480.

3. *Chun J., Lee J.-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B. K., Lim Y. W*. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57. – P. 2259–2261.

Novoselova N.N.[1], Ananina L.N.[2], Kuyukina M.S.[1,2], Ivshina I.B.[1,2]

TAXONOMIC REVISION USING 16S rRNA GENE ANALYSIS OF ACTINOBACTERIAL CULTURES MAINTAINED IN THE REGIONAL SPECIALIZED COLLECTION OF ALKANOTROPHIC MICROORGANISMS

[1] Perm State National Research University, Perm, Russia, nataniika@yandex.ru;

[2] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru

Summary. Based on the analysis of the sequenced 16S rRNA-gene, a taxonomic revision of the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms gene pool was performed. The authenticity of type strains of *Dietzia maris, Gordonia terrae, Rhodococcus coprophilus, R. erythropolis, R. globerulus, R. opacus, R. rhodnii, R. rhodochrous* and *R. ruber* was confirmed. Cultures of *Gordonia* sp. and *Rhodococcus* sp., not previously identified to the species level, were classified to *G. alkanivoranus, G. amicalis* and *R. qingshengii* based on 16S rDNA homology. Data of genetic analysis are consistent with the results of phenotypic, chemotaxonomic and immunochemical methods.

Key word: actinobacteria, bacterial taxonomy, 16S rRNA gene, sequencing.

УДК 579.222

Павлова Ю.А.[1,2], Неустроева А.Н.[1], Максимов А.Ю.[1,2], Демаков В.А.[1,2]

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ, pH И ИНГИБИТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЙ АМИДАЗЫ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия;

[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, pavlova_ua@mail.ru

Резюме. Исследовано влияние факторов реакционной среды (pH, температура, ингибиторы) на амидазную активность клеток штамма *Rhodococcus erythropolis* Б2 и ферментного препарата из этого штамма. Установлено, что исследуемая амидаза является термостабильным ферментом (максимум активности при 50°С) с pH оптимумом от 6 до 8. Показано, что активность амидазы подавляется сульфгидрильными реагентами.

Ключевые слова: амидаза, акрилат, *Rhodococcus erythropolis*.

Амидазы (КФ 3.5.1.4) – ферменты, катализирующие гидролиз амидов с образованием соответствующих карбоновых кислот и аммония. Они открыты у многих бактерий и эукариотических организмов различных таксономических групп, однако свойства многих подобных ферментов не исследованы в достаточной степени. Цель настоящей работы – исследование влияния факторов реакционной среды на активность энантиоселективной амидазы *Rhodococcus erythropolis*.

Для оценки зависимости работы фермента от кислотности среды измерена активность препарата амидазы по отношению к акриламиду в интервале pH 2,0–12,0 при 25°С (рис. 1).

Установлено, что препарат амидазы *R. erythropolis* Б2 имеет пик в диапазоне pH от 6,0 до 8,0, достигающий максимального значения при pH 7. За пределами этих значений pH наблюдается резкое снижение активности. При pH около 5,0 и 9,0 фермент проявлял лишь 50% своей активности. В то же время амидаза в составе клеток была высокоактивна в более широком диапазоне pH от 5,0 до 8,0. Максимальная активность в клетках в условиях эксперимента проявлялась при

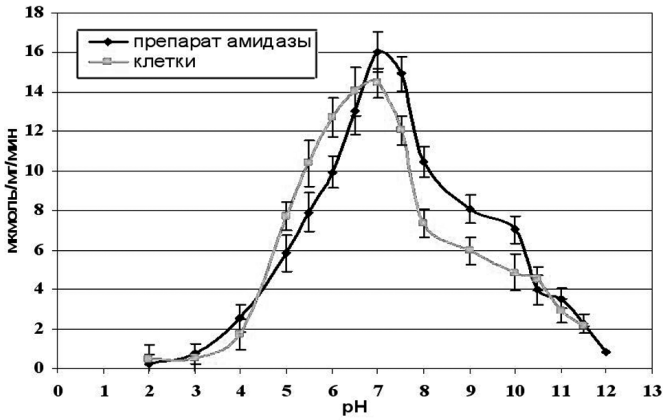


Рис. 1. Влияние pH на амидазную активность клетки и препарат амидазы *R. erythropolis* Б2.

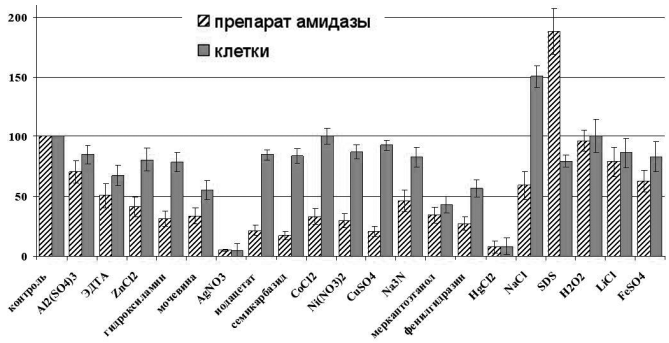


Рис. 2. Влияние ингибиторов на амидазную активность препарата амидазы и целых клеток *R.erythropolis* Б2.

pH 6,5-7,0.

Удельную амидазную активность клеток и препарата фермента измеряли в интервале температур от 5 до 80°С при pH 7,2 по изменению концентрации акрилата в течение 10 мин реакции. В условиях эксперимента максимум активности амидазы в ферментном препарате наблюдался при 50°С. При комнатной (25°С) температуре фермент проявлял лишь 50% максимальной активности. В составе клеток амидаза была более термостабильна – максимальная её активность наблюдалась при 55-60°С.

Исследовано влияние ряда потенциальных ингибиторов ферментов на активность амидазы в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,2 при температуре 25°С (рис. 2).

Активность фермента почти полностью подавлялась 1 мМ растворами солей серебра и ртути, что свидетельствует о наличии сульфгидрильных групп, играющих большую роль в каталитическом процессе и поддержании активной структуры фермента. Ингибирующее влияние на амидазную активность оказывал и йодацетат – реагент, специфически взаимодействующий с сульфгидрильными группами. Активность фермента также снижали гидроксиламин, мочевина, семикарбазид и фенилгидразин и меркаптоэтанол.

Хелатирующий агент ЭДТА не оказывал существенного влияния на активность амидазы. Это свидетельствует о том, что амидаза не является металлзависимым ферментом.

Увеличение активности амидазы в составе клеток вызывал хлорид натрия. Это свидетельствует о том, что для проявления максимальной активности фермента требуется большее количество растворенных солей, чем в стандартном 10 мМ фосфатном буфере. Активность препарата амидазы повышал додецилсульфат натрия (SDS), который в концентрации 1 мМ, по-видимому, стабилизировал фермент.

Показано, что фермент в составе клеток менее подвержен ингибирующему влиянию большинства ингибиторов, что, вероятно, связано с малой проницаемостью мембраны для используемых агентов и действием стабилизирующих внутриклеточных факторов.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009–2013 гг.», шифр 2009-1.1-201-018-001.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fornaud D., Arnaud A.* Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity // Appl. Microbiol. – 2001. – V. 9. – P. 381– 393.

2. *Перцович С.И., Гуранда Д.Т., Подчерняев Д.А.* Алифатическая амидаза *Rhodococcus rhodochrous* – представитель семейства нитрилаз/цианидгидратаз // Биохимия.
– 2005. – Т. 70. № 11. – С. 1556–1565.

3. *Kotlova E.K., Chestukhina G.G., Astaurova O.B., Leonova T.E., Yanenko A.S., Debabov V.G.* Isolation and primary characterization of an amidase from *Rhodococcus rhodochrous* // Biochemistry. – 1999. – V. 64. N. 4. – P. 384–389.

Pavlova Yu.A.[1,2], Neustroeva A.N.[1], Maksimov A.Yu.[1,2], Demakov V.A.[1,2]

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TEMPERATURE, pH AND INHIBITORS ON THE ENANTIOSELECTIVE AMIDASE ACTIVITY OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia;

[2]Perm State National Research University, Perm, Russia, pavlova_ua@mail.ru

Summary. The influence of the reaction medium factors (pH, temperature, inhibitors) on the amidase activity of *Rhodococcus erythropolis* B2 and the enzyme preparation from this strain was investigated. It was established that the studied amidase was a thermostable enzyme (maximum activity at 50°C) with an optimum pH from 6 to 8. It was shown that the amidase activity was inhibited by sulfhydryl reagents.

Key words: amidase, acrylate, *Rhodococcus erythropolis*.

УДК 579.222.4

Перебатова Е.А.[1,2], Ремезовская Н.Б.[2], Максимов А.Ю.[1,2]

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ШТАММОВ ПОЧВЕННЫХ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ И АКТИНОБАКТЕРИЙ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия;

[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, renata@iegm.ru

Резюме. Исследовано влияние различных факторов среды на эстеразную активность частично очищенных ферментных препаратов ряда эфир-трансформирующих почвенных бактерий. Обнаружено, что оптимум активности ферментов проявляется в слабощелочной среде. Эстеразы исследованных штаммов относятся, вероятно, ко второму классу липолитических ферментов с активным центром, содержащим каталитическую триаду Ser-Asp-His.

Ключевые слова: эстеразы, почвенные бактерии, ферментные препараты.

Введение

В настоящее время бактериальные эстеразы применяются в раз-

личных сферах, таких как сельское хозяйство, пищевая и фармацевтическая промышленность [1]. Разностороннее применение обусловливает огромный интерес к данной группе ферментов. Значительная роль отводится изучению влияния различных условий внешней среды на эстеразную активность, что позволяет сделать выводы о механизме действия фермента. Цель настоящей работы – исследование зависимости активности частично очищенной эстеразы от температуры, pH среды и ингибиторов ферментов.

Материалы и методы исследования

Количественное определение эстеразной активности выполняли фотоэлектроколориметрическим методом при λ =410 нм с использованием в качестве субстрата р-нитрофенилбутирата. Реакцию проводили в течение 30 мин при температуре и pH, соответствующих условиям эксперимента. Единица эстеразной активности (1ЕД) соответствовала 1 мкмоль р-нитрофенола/мин/мг сухого веса клеток. Разрушение бактериальных клеток осуществляли с помощью ультразвуковой дезинтеграции в различных режимах. Частично очищенный фермент получали осаждением сульфатом аммония разными процентами насыщения.

Результаты и обсуждение

В результате определения влияния pH среды на эстеразную активность ферментов обнаружено, что эстеразы, выделенные из грамотрицательных бактерий, имеют достаточно широкий диапазон оптимума pH. Ферментный препарат из штамма *Pseudomonas* sp. ЛН 4 обнаруживал максимум активности при pH 7–7,5, затем происходило незначительное снижение и выход на плато до pH 9,5, после чего активность резко падала до нуля при pH 10,5. Аналогичную динамику демонстрировала эстераза из штамма *Brevundimonas* sp. ЛН 3. Напротив, эстераза из *Rhodococcus erythropolis* 10л имеет более узкий оптимум активности в зоне pH 8,5-10 с максимумом при pH 9–9,5. Полученные результаты согласуются с литературными данными о границах оптимума pH для некоторых форм бактериальных эстераз [2].

Полученные препараты эстераз демонстрировали также различные профили термозависимости эстеразной активности. Эстеразы из штаммов *Pseudomonas* sp. ЛН 4 и *Brevundimonas* sp. ЛН 3, выделенных из подзолистой луговой почвы, имели максимум активности при 35–40°С, к концу периода измерения (75°С) активность снижалась до 45–50% от максимальной, при этом показатели активности в интервале температур 55–75°С были ниже, чем таковые при 10–15°С. Ферментные препараты из штаммов *Pseudomonas* sp. ОВ 1 и *Alcaligenes* sp. ОН 8, селекционированных из аллювиальной почвы, имели более широкий диапазон оптимальных температур, начиная с 35°С до 70°С эстеразная активность оставалась практически на одном уровне, изменяясь в пределах 10–20% от максимальной (45°С для *Alcaligenes* sp. ОН 8 и 55°С для *Pseudomonas* sp. ОВ 1). Оптимум активности частично очищенной эстеразы из *R. erythropolis* 10л был сдвинут в зону более высоких температур – от 45 до 70°С с максимумом при 60°С. Характерно, что даже при увеличении температуры до 80°С, 30-минутная инкубация ферментного препарата, в отличие от аналогичного воздействия на цельные клетки, не приводила к полной инактивации эстеразы, в разных случаях сохранялось от 40 до 80% максимальной активности.

Анализ влияния ингибиторов различных классов на эстеразную активность показал, что значительным ингибирующим эффектом на ферментные препараты обладали соли тяжелых металлов ($HgCl_2$ – от 40,5 до 0%, $AgNO_3$ – от 50 до 9%, $CuSO_4$ – от 42,3 до 7,2% остаточной активности), что свидетельствовало о вероятном наличии тиоловых групп в активном центре. Судя по незначительному влиянию хелатирующих агентов на активность фермента, эстеразы, скорее всего, не имели атомов металлов в активном центре. Значительное (более 50%) ингибирование эстеразной активности ферментных препаратов из разных штаммов происходило при воздействии H_2O_2. Ингибитор сериновых протеаз – фенилметилсульфонилфторид (FMSF), сульфонирующий ферменты только по остатку гистидина, в большей степени воздействует на эстеразы из *R. erythropolis* 10 л и *Alcaligenes* sp. ОН 8 – 42,7% и 51,4% остаточной активности, соответственно. SDS значительно снижало активность всех штаммов, особенно – эстераз из штаммов *Brevundimonas* sp. ЛН 3 и *Pseudomonas* sp. ЛН 4 – 4,5-7% остаточной активности. Для остальных соединений было характерно незначительное ингибирование. Воздействие $CoCl_2$ и 2-меркаптоэтанола на эстеразы из штаммов *Pseudomonas* sp. ЛН 4 и *Brevundimonas* sp. ЛН 3 вызывало индукцию до 40% от активности фермента в контрольном варианте. Возможно, при действии 2-меркаптоэтанола происходит восстановление дисульфидных связей, что, в конечном счете, стабилизирует структуру белка.

Заключение

Результаты анализа влияния ингибиторов на активность ферментов свидетельствовали о том, что эстеразы используемых в работе штаммов относятся, скорее всего, ко второму классу липолитических ферментов с активным центром, содержащим классическую каталитическую триаду Ser-Asp-His.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и РФФИ № 11-04-96038-р_урал_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bornscheuer U.T.* Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis // FEMS Microbiology Reviews. – 2002. – V. 26. – P. 73–81.

2. *Panda T., Gowrishankar B.* Production and applications of esterases // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – V. 67. – P.160–169.

Perebatova E.A.[1,2], Remezovskaya N.B.[2], Maksimov A.Yu.[1,2]

EFFECT OF THE ENVIRONMENT ON ESTERASE ACTIVITY OF THE ENZYME PREPARATION OBTAINED FROM STRAINS OF SOIL PROTEOBACTERIA AND ACTINOBACTERIA

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, renata@iegm.ru;

[2]Perm State National Research University, Perm, Russia

Summary: The effect of various environmental factors on the esterase activity of partially purified enzyme preparations of some ester-transforming soil bacteria was investigated. It was found that the optimum of enzyme activity is manifested in a slightly alkaline medium. Esterases of the studied strains are probably in the second class of lipolytic enzymes with active site comprising the catalytic triad Ser-Asp-His.

Key words: esterases, soil bacteria, enzyme preparations.

УДК 574.24

Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Ерошенко Д.В., Коробов В.П.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* 33

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, poludova@iegm.ru

Резюме. Изучены первые этапы формирования биопленок *Staphylococcus epidermidis* 33 на гидрофобной поверхности полистирола. Сорбция бактерий лог-фазы планктонной культуры во многом зависит от уровня кислотности среды, содержания глюкозы и катионов Na^+ и K^+. Внесение в среду LB глюкозы (0,1, 0,2 и 0,5%) способствует увеличению сорбции бактериальных клеток, при этом наибольшая сорбция бактерий наблюдается в зонах pH, отличающихся от оптимальных для роста планктонных культур этого вида стафилококков. Введение в среду формирования биопленок хлоридов натрия и калия приводит к увеличению биомассы пленок и содержания в них жизнеспособных клеток, при этом наибольшим эффектом обладают катионы натрия.

Ключевые слова: адгезия, стафилококки, pH, глюкоза, катионы натрия и калия.

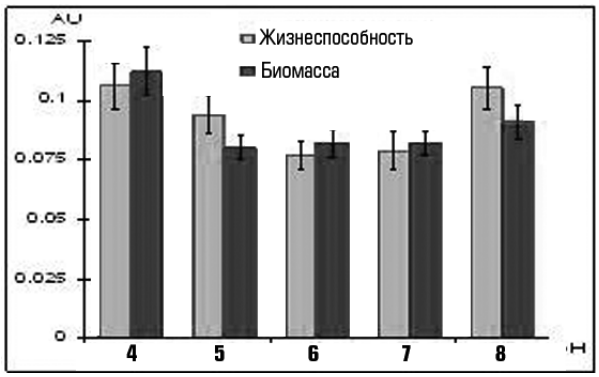


Рис. 1. Адгезия клеток *S. epidermidis* 33 при изменении pH среды.

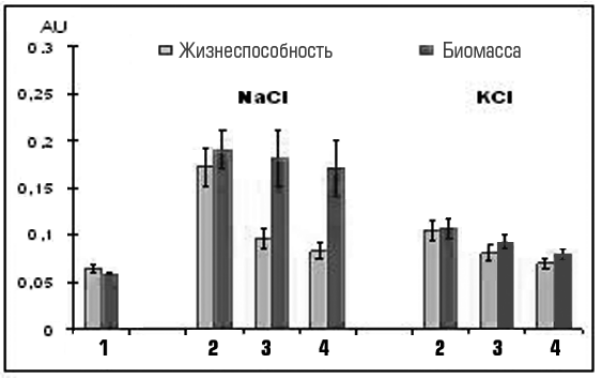


Рис. 2. Влияние солей на клеточную адгезию S. epidermidis 33: 1 – контроль; 2 – 50 mM; 3 – 100 mM; 4 – 150 mM

Введение

Лечение бактериальных инфекций становится всё более сложным за счет быстрого появления устойчивости возбудителей к наиболее используемым в практике антибиотикам [1] и формирования бактериальных биопленок, резистентность клеточных элементов которых к антибиотическим соединениям значительно возрастает [2]. Это определяет необходимость поиска новых подходов к лечению заболеваний, обусловленных образованием бактериальных пленок. Особенно важным становится изучение механизмов самых первых этапов образования биопленок – адгезии бактериальных клеток на соответствующих поверхностях [3] с анализом факторов, влияющих на сорбционные свойства бактерий.

Целью данного исследования была количественная оценка влияния некоторых факторов внешней среды – pH, концентрации глюкозы и солей на\адгезию бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 к гидрофобной поверхности полистирола.

Материалы и методы исследования

Бактерии *S. epidermidis* 33 экспоненциальной фазы роста на среде LB дважды промывали 10 mM фосфатным буфером (pH 7,2), осаждали при 3000 g на центрифуге «Eppendorf» 5415R, суспендировали в среде LB до концентрации 107 КОЕ/мл и вносили в полистироловые 12-луночные планшеты («Greiner»). Для изучения действия на сорбцию бактериальных клеток различных внешних факторов в среду LB добавляли глюкозу до концентрации 0,1, 0,2 или 0,5%, растворы KCl и NaCl до концентрации 50, 100 и 150 mM или изменяли кислотность среды внесением 0,1 M HCl или 0,1 M NaOH до значений pH 4 – 8. Затем планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин, несвязавшиеся клетки удаляли осторожным отсасыванием и трижды промывали фосфатным буфером (pH 7,2). О массе сорбированных клеток судили по связыванию кристаллического фиолетового (GV) при окрашивании 0,1% раствором красителя; количество живых клеток выявляли по способности восстановления MTS-тетразолия до водорастворимого формазана, используя пропись фирмы «Promega».

Результаты и обсуждение

Введение в инкубационную среду (pH 6,95-7,05) глюкозы в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,5% сопровождалось увеличением сорбции клеток на поверхность полистирола. При этом биомасса сорбированных элементов возрастала, соответственно, на 3, 18 и 15%, а количество жизнеспособных клеток – на 20, 35 и 60%.

Адгезия бактерий во многом определялась кислотностью среды. При этом, отклонение от pH, оптимального для роста планктонных клеток (pH 7,0-7,2) как в кислую, так и в щелочную сторону, приводило к увеличению сорбции бактериальных клеток (рис. 1). Возможно, это связано со значительным изменением дзета-потенциала бактериальных клеток при резких изменениях кислотности среды, обуславливающих внутренние сдвиги в диссоциации ионных группировок в клеточных стенках бактерий [4].

Существенное влияние на сорбцию клеток оказывало также наличие в среде одновалентных катионов. Как видно из рис. 2, наибольшим эффектом обладали ионы Na^+. Повышение концентрации NaCl до 50 mM сопровождалось резким увеличением биомассы пленок (в 3 раза) и числа сорбированных жизнеспособных клеток. Дальнейшее увеличение концентрации NaCl до 100 mM и 150 mM не приводило к нарастанию массы сорбированных клеток, но сопровождалось снижением количества содержащихся в ней жизнеспособных клеток. Введение в среду ионов K^+ также приводило к увеличению числа сорбированных клеток и их жизнеспособности, но было выражено в значительной меньшей степени по сравнению с введением в среду ионов Na^+.

Заключение

Таким образом, результаты изучения действия различных факторов среды на сорбцию бактерий *S. epidermidis* 33 поверхностью полистирола позволяют констатировать активацию этого процесса при наличии в среде глюкозы, имеющей при использованных концентрациях линейный характер. В то же время, влияние на этот процесс уровня pH и концентрации одновалентных катионов является нелинейным, вследствие наличия характерных для каждой ситуации минимумов.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 10-04-96086-р_урал_а, 11-04-96025-р_урал_а, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 09-П-4-1019 и УрО РАН №№ 09-М-14-2002, 10-14-НАБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сидоренко С.Д., Тишков В.И.* Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.

2. *Николаев Ю.А., Плакунов В.К.* Биоплёнка – “город микробов” и аналог многоклеточного организма // Микробиология. – 2007. – Т. 76(2). – С. 149–163.

3. *Klemm P., Vejborg R.M., Hancock V.* Prevention of bacterial adhesion // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 88. – PP. 451–459.

4. *Hong Y., Brown D.G.* Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface // Langmuir. – 2008. – V. 24(9). – P. 5003–5009.

Poludova T.V., Lemkina L.M., Eroshenko D.V., Korobov V.P.

EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON INITIAL STAGES OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* 33 BIOFILM FORMATION

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS,

Perm, Russia, poludova@iegm.ru

Summary. The initial stages of *S. epidermidis* 33 biofilm formation on polystyrene hydrophobic surface were analyzed. It was found that bacterial sorption in the log-phase of planktonic culture markedly depended on the level of the medium acidity, glucose and Na^+ and K^+ cation contents. Addition of glucose (0.1, 0.2 and 0.5%) in LB medium favored the increase in bacterial cell sorption; and in this case, the highest bacterial sorption was observed in pH regions other than optimal ones for planktonic culture growth of this type of staphylococci. Addition of NaCl and KCl in the medium resulted in augmentation of film biomass and viable cell content therein, while sodium cations had the greatest effect.

Key words: adhesion, *Staphylococcus*, pH, glucose, sodium and potassium cations.

УДК 602.3+582.282.23

Романова М.А., Атыкян Н.А., Ревин В.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* РАС «АНГЕЛ» И «XII» ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В СУСЛЕ ПОВЫШЕННОЙ ПЛОТНОСТИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия, romanovamariaa@gmail.com

Резюме. Проведен сравнительный анализ биохимической активности различных рас дрожжей при культивировании в плотном сусле.

Ключевые слова: дрожжи, сусло, брожение, биохимическая активность.

Введение

Сбраживание высокоплотного сусла – процесс, направленный на повышение скорости брожения и конечной концентрации этанола в бражке и тем самым способствующий снижению соответствующих затрат на производство. Лабораторные исследования показали, что при полном сбраживании высокоплотного пшеничного сусла, содержащего 38% растворенных сухих веществ, можно добиться накопления этанола в бражке до 23% (об.).

В промышленности брожение с высоким содержанием сахара в сусле считается нецелесообразным из-за проблем с дрожжами. Высокое содержание углеводов в среде в процессе брожения приводит к увеличению осмотического давления, которое оказывает пагубное влияние на дрожжевые клетки сахаромицетов, обычно используемые для спиртового брожения [1]. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение биохимической активности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* рас «Ангел» и «XII» при культивировании в плотном сусле для последующего получения наиболее оптимального выхода спирта.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили активированные дрожжевые культуры *Saccharomyces cerevisiae* рас «Ангел» и «XII», а также зерновое сусло с концентрацией сухих веществ более 20° Вх. Зерновое сусло представляло собой осахаренную смесь зерновых культур – рожь:ячмень:пшеница в соотношении 1:1:1 с гидромодулем 1:2. Предварительно осуществляли двухстадийное дробление зернового сырья. Первую стадию измельчения проводили до размера, который характеризуется 80-90%-ным проходом через сито с диаметром ячеек 1 мм. Это так называемая стандартная степень измельчения. Помол с таким размером частиц используют в классических технологиях спирта в промышленности. Далее измельчение проводили на вариопланетарной шаровой мельнице PM 100 (“Retsch“, Германия) с пределом измельчения менее 1 мкм – ультрадисперсное измельчение. Такое измельчение позволяет снизить температуру водно-тепловой обработки при производстве спирта [2]. Сбраживание проводили в биореакторах BIOSTAT®A plus-Sartorius в течение 72 ч при 30°С. Определение показателей качества сусла, зрелой бражки проводили согласно инструкции по технохимическому и микробиологическому контролю спиртового производства [3].

Результаты и обсуждение

Биохимическая активность дрожжей и интенсивность брожения зависит от их физиологического состояния. Количественно эти показатели могут быть оценены двумя способами: по выходу образовавшегося этанола и объему выделившейся углекислоты.

В ходе эксперимента была изучена бродильная активность дрожжей, о которой судили по количеству углекислоты, выделившейся в единицу времени из определенного объема среды, приготовленной из ультрадисперсного зернового сырья.

Как видно из рис. 1а, максимальная бродильная активность наблюдалась при использовании расы «Ангел» и количество выделившейся углекислоты составляло 8,57 г/100 мл на 24 ч культивирования, что на 4,5% выше, чем при использовании расы «XII» (рис. 1б). На 72 сут брожения разница составляла более 23%. Следовательно, дрожжи расы «Ангел» проявляли более высокую биохимическую активность, что можно проследить, сравнив количество выделившейся углекислоты.

Этиловый спирт – конечный продукт брожения. Анализ содержания этанола показал, что накопление спирта в бражке, полученной с использованием дрожжей расы «Ангел», составляло 9,63% (об.), что на 2% больше, чем в бражке, полученной с использованием дрожжей расы «XI».

Заключение

Наибольшую биохимическую активность в эксперименте проявили дрожжи расы «Ангел». При использовании этой расы дрожжей наблюдался наибольший выход спирта и максимальное количество выделившейся углекислоты. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что дрожжи расы «Ангел» более устойчивы к высокому содержанию сахара в среде, а также продуктам метаболизма. Данная раса более приемлема для использования в технологии производства этилового спирта из плотного сусла.

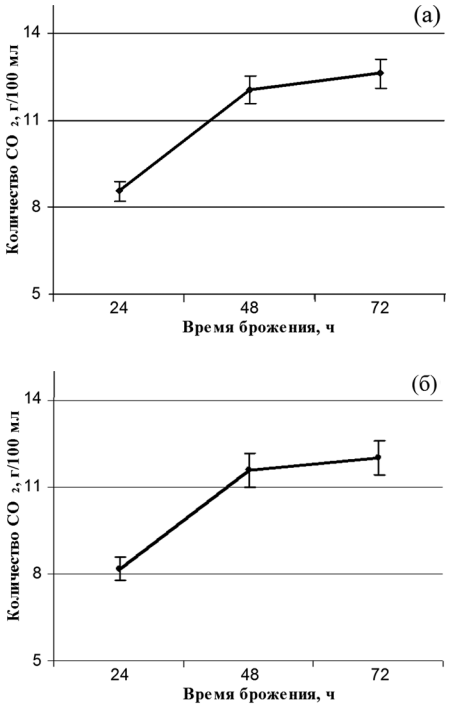


Рисунок. Динамика выделения CO2 в процессе спиртового брожения. (а) – Раса «Ангел»; (б) – раса «XII».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Alison M., Ingledew W.M.* Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60 (3). – P. 1048–1051.

2. *Ревин В.В., Атыкян Н.А.* Способ получения спирта // Патент на изобретение РФ 2407798. Заявл. 22.04.2009. Зарег. в Госреестре изобр. 27.12.2010.

3. Инструкция по технохимическому и микробиологическому контролю спиртового производства. 7-е издание, дополненное. – М.: ДеЛи принт, 2007. – 485 с.

Romanova M.A., Atykyan N.A., Revin V.V.

THE BIOCHEMICAL ACTIVITY OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DURING HIGH DENSITY WORT FERMENTATION

Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia, romanovamariaa@gmail.com

Summary. Analysis of the biochemical activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during high density wort fermentation was performed.

Key words: yeast, wort, fermentation, biochemical activity.

УДК 579.2 – 579.26 – 579.6

Рубцова Е.В.[1], Криворучко А.В.[1,2], Ноговицына Е.М.[2], Куюкина М.С.[1,2], Ившина И.Б.[1,2]

АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА Tn5-МУТАНТОВ РОДОКОККОВ

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, rev85@rambler.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия

Резюме. В результате неспецифического *in vivo* Tn5-мутагенеза клеток *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 получены мутантные клоны с различной адгезивной активностью в отношении жидких (*н*-гексадекан) и твердых (полистирол) гидрофобных соединений. Выявлена зависимость интенсивности роста мутантов в присутствии углеводородов от степени их адгезии к данным субстратам. Экспериментально обосновано участие *Rhodococcus*-биосурфактантов в процессах адгезии родококков к твердой поверхности. Отобраны мутантные клоны с высокой адгезивной активностью, способные к направленной трансформации β-ситостерола.

Ключевые слова: адгезия, родококки, Tn5-мутагенез, *Rhodococcus*-биосурфактанты, биотрансформация.

Введение

Актинобактерии рода *Rhodococcus* – биотехнологически перспективная группа микроорганизмов, осуществляющих окислительную трансформацию широкого спектра органических веществ (алифатических и ароматических углеводородов, стеролов, тритерпеноидов, изохинолинов, органических сульфидов). Начальным этапом биологического окисления гидрофобных соединений является адсорбция микробных клеток на поверхности жидкого либо твердого субстрата, при этом эффективность данного процесса зависит от адгезивной активности адсорбируемых микроорганизмов. Роль адгезии в окислительной трансформации гидрофобных органических соединений клетками родококков практически не изучена. Эффективным способом исследования функциональных свойств бактериальных клеток на фенотипическом и генотипическом уровнях является метод неспецифического транспозонного (Tn5) мутагенеза, который ранее не применялся для изучения процессов бактериальной адгезии. Цель настоящей работы – исследование адгезивной активности Tn5-мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231 в отношении жидких и твердых гидрофобных соединений.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *R. ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WFCC #768, www.iegm.ru/iegmcol), который выращивали в среде Лориа-Бертани (LB) или минеральной среде с *н*-гексадеканом при 28°С, 160 об/мин, в течение 28-46 ч. Для получения инсерционных мутаций в бактериальной хромосоме использовали транспозому EZ::TN™ <KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre Technologies, США), представляющую собой молекулярный комплекс фрагмента ДНК (транспозон Tn5 с геном устойчивости к канамицину) и белка транспозазы [1]. Трансформацию клеток родококков проводили путем электропорации. Присутствие Tn5 в бактериальной ДНК подтверждали с помощью ПЦР. Ростовые характеристики Tn5-мутантов определяли по приросту биомассы и изменению оптической плотности (ОП600 нм) клеточной суспензии. Определение степени адгезии родококков к *н*-гексадекану проводили с помощью MATH-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) [2]; адгезивную активность бактерий в отношении твердой поверхности изучали с использованием 96-луночных полистирольных микропланшетов (Медполимер, Санкт-Петербург) по окрашиванию прикрепленных клеток кристаллическим фиолетовым. Способность мутантных штаммов к синтезу *Rhodococcus*-биосурфактантов подтверждали эмульсионным тестом по индексу эмульгирования *н*-гексадекана через 1, 24, 48 и 72 ч. Суммарные клеточные липиды определяли весовым методом после экстракции смесью хлороформ-метанол (2:1). Каталитическую активность Tn5-мутантов оценивали в экспериментах по направленной биотрансформации β-ситостерола, продукты окисления которого учитывали с помощью УФ спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии [3].

Результаты и обсуждение

По нашим данным, более 90% исследованных мутантных клонов проявляли пониженную (на 17–38%) адгезивную активность в отношении *н*-гексадекана по сравнению с родительским штаммом (табл. 1). На примере полученных Tn5-мутантов показано, что способность родококков к росту в присутствии углеводородных соединений (*н*-гексадекана, в частности) строго коррелирует (R=0,94, p=0,006) с их адгезивной активностью. Так, накопление клеточной биомассы у Tn5-мутантов с наиболее высокими (80–97%) показателями адгезии достигало 2,6–4,1 г сухих клеток/л среды, в то время как у мутантов со средними (60–79%) показателями адгезии данный показатель не превышал 1,4–2,5 г сухих клеток/л среды. Следует отметить, что полученный мутантный клон 61, дефицитный по адгезивной активности и не способный к росту на *н*-гексадекане, характеризовался наиболее гидрофильной клеточной стенкой (количество суммарных липидов 5,4 ± 0,76% от сухого веса клеток, что в 10 раз меньше по сравнению с таковым родительского штамма).

Таблица 1.

Адгезивная активность и показатели роста Tn5 мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231

Исследуемые мутантные клоны	Степень адгезии к *н*-гексадекану, %	Клеточная биомасса, г/л
R. ruber ИЭГМ 231 (исходный штамм)	96,6 ± 2,4	4,4 ± 0,1
2; 3; 4; 7; 9; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 21; 22; 30; 35; 42; 46; 49; 50; 119;137	80±4,3 – 97±2,5	2,6±0,05 – 4,1±0,63
7; 25; 31; 58; 66; 87; 110	60±3,1 – 79±4,2	1,4±0,52 – 2,5±0,46
61	0	0

Как видно из табл. 2, большинство мутантных клонов проявляли повышенную (в 1,4–3,4 раза) адгезивную активность в отношении полистирола по сравнению с родительским штаммом; при этом лишь у одного мутанта наблюдалось снижение степени адгезии в 2,8 раза. При этом Tn5-мутанты с высокой (60–73%) адгезивной активностью характеризовались повышенной (Е1=87%) эмульгирующей способностью и высоким (86,0 мг/г сухих клеток) содержанием клеточных липидов, что свидетельствует о стимулирующем влиянии *Rhodococcus*-биосурфактантов на процессы адгезии родококков к твердой поверхности.

Таблица 2.

Адгезивная и эмульгирующая активность Tn5-мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231

Исследуемые мутантные клоны	Степень адгезии к полистиролу, %	Эмульгирующая активность (Е), %	Суммарные клеточные липиды, мг/г
Исходный штамм *R. ruber* ИЭГМ 231	28	Е1 ч=68, Е24 ч=17, Е48 ч=12, Е72 ч=10	54,0±5,0
22; 30; 35	30-34	Е1 ч=63, Е24 ч=6, Е48 ч=4, Е72 ч=0	54,0±7,6
7; 9; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 21; 22; 30; 35; 42; 46	47-51	Е1 ч=65, Е24 ч=10, Е48 ч=11, Е72 ч=10	66,0±7,6
49; 50; 119;137	60-73	Е1 ч=87, Е24 ч=25, Е48 ч=25, Е72 ч=23	86,0±4,8

Сравнительный анализ каталитической активности полученных Tn5-мутантов выявил четкую зависимость между адгезивной активностью родококков и эффективностью направленной трансформации β-ситостерола в целевой продукт – стигмаст-4-ен-3-он. Так, мутантные клоны с высокими (60–73%) показателями адгезии к твердой поверхности на 40% эффективнее окисляли β-ситостерол по сравнению с исходным штаммом и Tn5-мутантами с более низкими (32–51%) показателями адгезии. При этом выход целевого продукта в общей сумме продуктов реакции достигал 85–98%. В результате исследования отобран мутантный штамм родококков, характеризующийся максимальной (4 мг/(л•ч)) скоростью трансформации β-ситостерола, перспективный для биотехнологического использования.

Исследование выполнено при поддержке грантов Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-64403.2010.4, РФФИ-р_урал_а № 11-04-96045, Междисциплинарного проекта фундаментальных исследований (номер гос. регистрации 01200963678), выполняемых в учреждениях УрО РАН, и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК №16.518.11.7069; 16.513.12.3015).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fernandes P.J., Powell J.A., Archer A.C.* Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 2529–2536.
2. *Rosenberg M.* Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty–five years of doing MATH // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – V. 262. N. 2. – P. 129–34.
3. *Гришко В.В., Ноговицина Е.М., Ившина И.Б.* Биокаталитическое получение физиологически активных соединений на основе растительного β ситостерола // Катализ в промышленности. – 2009. – № 1. – С. 67–74.

Rubtsova E.V.[1], Krivoruchko A.V.[1,2], Nogovitsina E.M.[2], Kuyukina M.S.[1,2], Ivshina I.B.[1,2]

ADHESIVE PROPERTIES OF Tn5 *RHODOCOCCUS* MUTANTS

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, rev85@rambler.ru;
[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

Summary. Tn5 mutants with various adhesive activity toward liquid (n-hexadecane) and solid (polystyrene) hydrophobic compounds were obtained using non-specific *in vivo* transposon mutagenesis of *Rhodococcus ruber* IEGM 231. The effect of bacterial cell adhesion on the ability of rhodococci to grow in the presence of hydrocarbons was studied. Participation of *Rhodococcus*-biosurfactants in the adhesion of bacterial cells to solid surfaces was revealed. The *R. ruber* mutants with high adhesive activity and the ability for oxidative transformation of β-sitosterol were selected.

Key words: adhesion, *Rhodococcus actinobacteria*, Tn5 mutagenesis, biosurfactants, biotransformation.

УДК 579.222

Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, samzu@mail.ru

Резюме. В последние годы накапливаются данные о том, что наряду со специфическим действием, антибиотики, принадлежащие к различным классам, могут вызывать в культурах бактерий явления, характерные для окислительного стресса. В связи с этим, актуально исследование модифицирующего влияния редокс-активных веществ на действие антибиотиков. Особый интерес в этом отношении представляют растительные полифенолы, входящие в состав продуктов питания, фармпрепаратов и косметических средств и обладающие про- и антиоксидантной активностью. Находясь в кишечнике человека и животных, бактерии *Escherichia coli* могут прямо контактировать как с противомикробными препаратами, так и с полифенолами. Целью данной работы было изучение влияния полифенолов на действие антибиотиков в культурах бактерий *E. coli*. Наибольшим протективным действием обладали кверцетин и танин. Показано, что эти полифенолы могут защищать клетки бактерий от токсического действия антибиотиков. Полученные данные могут быть использованы для повышения эффективности антибиотикотерапии.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, антибиотики, полифенолы.

Нами было исследовано влияние полифенолов: кверцетина, рутина, танина, катехина, нарингенина и гесперетина – на устойчивость бактерий E*scherichia coli* к антибиотикам. Эффект полифенолов сравнивался с активностями стандартного антиоксиданта тролокса и хелаторов железа, дипиридила и дефероксамина. Испытывалось действие этих соединений на величину МИК ципрофлоксацина, канамицина, хлорамфеникола, рифампицина и ампициллина в культурах *E. coli* AB1157. Ни одно из испытуемых соединений не усиливало действие антибиотиков. В то же время, кверцетин и, в меньшей степени, танин оказывали протективное действие против ципрофлоксацина, повышая значение МИК. Не отмечено достоверного изменения МИК для остальных антибиотиков при действии всех испытуемых соединений. Измерение удельной скорости роста в культурах *E. coli* NM23 и QC772, обработанных ципрофлоксацином, показало, что так же как и в тесте на определение МИК, ни одно из испытуемых соединений не усиливало действие антибиотиков, скорее наоборот, два полифенола, кверцетин и танин, оказывали выраженное протективное действие.

Ранее было показано, что при токсическом действии антибиотиков на бактерии обнаруживаются признаки окислительного стресса, одним из которых может быть активация экспрессии антиоксидантных регулонов [1]. Ген *katG* кодирует каталазу-гидропероксидазу I (HPI) и является членом OxyR-регулона, участвующего в адаптации к пероксидному стрессу. Ген *sodA* кодирует Mn-зависимую супероксиддисмутазу (Mn-SOD), катализирующую дисмутацию супероксида ($O_2^{\cdot-}$) с образованием H_2O_2 и O_2. Повышение экспрессии обоих генов рассматривается как один из показателей окислительного стресса и активации антиоксидантной защиты клеток. В этой работе мы определяли экспрессию генов *katG* и *sodA* в интересующих нас ситуациях, используя штаммы *E. coli*, несущие слияние промоторов указанных генов со структурным геном β-галактозидазы. Обработка *E. coli* NM23, QC772 и BN407 полифенолами и хелаторами в отсутствие антибиотика приводила в большинстве случаев к небольшому изменению экспрессии слияний *katG::lacZ*, *sodA::lacZ* в ту или иную сторону. Наиболее существенные изменения экспрессии наблюдались у *E. coli* NM23, в которых экспрессия *katG::lacZ* при действии 0,1 мМ кверцетина, танина и рутина увеличивалась на 35-45% по сравнению с контролем. Присутствие в среде 0,05-0,1 мМ кверцетина и танина значительно снижало экспрессию *katG::lacZ* и *sodA::lacZ*, индуцированную ципрофлоксацином на 25-40%. В этих условиях остальные полифенолы не оказывали существенного влияния на экспрессию трех слияний. Не отмечено корреляции между протективным действием полифенолов и их влиянием на экспрессию слияний. Хелаторы в концентрации 0,1-0,2 мМ повышали экспрессию *sodA::lacZ*, стимулируемую ципрофлоксацином на 60-90%.

В нашей предыдущей работе было показано, что кверцетин и танин значительно увеличивали устойчивость *E. coli* к пероксидному стрессу [2]. Наблюдаемая протекция могла быть результатом двух перекрывающихся эффектов: индукцией OxyR-регулона низкими концентрациями H_2O_2, накапливаемыми в процессе внутриклеточного аутоокисления кверцетина и танина, и ингибированием реакции Фентона за счет хелатирования железа этими полифенолами. Можно предположить, что антиоксидантные свойства обоих полифенолов могут вносить вклад в наблюдаемое нами снижение бактериостатического действия ципрофлоксацина. Наши данные позволяют предположить, что некоторые полифенолы, являясь компонентами многих продуктов питания и лекарственных средств, могут взаимодействовать с антибиотиками, назначаемыми при лечении, модифицируя их действие. Требуются дальнейшие исследования для подтверждения этого предположения.

Работа поддержана грантами Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и РФФИ (№10-04-96017-р_ура_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J.* A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. – V. 130. – P. 97–810.
2. *Smirnova G.V., Samoylova Z.Y., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N.* Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress // Free Radic. Biol. Med. – V. 46. – P. 759–768.

Samoylova Z.Y., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF POLYPHENOLS ON SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA TO ANTIBIOTICS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

UB RAS, Perm, Russia, samzu@mail.ru

Summary. Over the last decades, an intense investigation has demonstrated that oxidative stress pathways are involved in lethality of antibiotics with different mechanisms of action. These findings reveal the possible antibiotic action modification in the presence of redox-active compounds with pro- and antioxidant activity. In recent years, an increasing interest has been given to polyphenols. These substances comprise plant nutrition products, medicinal and cosmetics preparations. The aim of the present study was to investigate the influence of the plant extracts and individual polyphenols on antibiotic action in *E. coli* cultures. It has been shown that among polyphenols tested, quercetin and tannin have remarkable protective effects against ciprofloxacin. The obtained data may be used to enhance the efficacy of the current antibacterial therapy.

Key words: *Escherichia coli*, antibiotics, polyphenols.

УДК 579.264 +615.035–615.33+ 616.34

Семенов А.В.

ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО АНТАГОНИЗМА В УСЛОВИЯХ МЕЖМИКРОБНЫХ ОТНОШЕНИЙ

Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза

Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, lever3@yandex.ru

Резюме: Установлено, что антагонизм доминантных представителей нормальной микрофлоры человека (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*) в условиях межмикробных отношений подвержен регуляции. Проведенные фундаментальные исследования позволили предложить новые механизмы формирования и функционирования микробиоценозов человека, направленных на поддержание колонизационной резистентности биотопа, через регуляцию защитных свойств доминантной микрофлоры ассоциативными микроорганизмами, а также позволили обосновать высокий практический и инновационный потенциал микробных стимуляторов бактериального антагонизма и способов их применения.

Ключевые слова: межмикробные отношения, антагонизм, ассоциативные микроорганизмы, пробиотики.

Одной из проблем современной экологии микроорганизмов является недостаточная изученность свойств микроорганизмов при межмикробных взаимодействиях. Антагонистические свойства лежат в основе механизмов формирования и функционирования микробиоценозов, а также используются при получении противоинфекционных средств. Исследование бактериального антагонизма в условиях межмикробных отношений позволило нам установить, что антагонистическая активность (АА) штамма – результат взаимодействий между микроорганизмами, где активный штамм выполняет роль продуцента антимикробных веществ, а ассоциативные микроорганизмы определяют возможность и выраженность проявления антагонизма. Установлено, что АА доминантных представителей нормальной микрофлоры человека – лакто-, бифидобактерий, энтерококков и кишечной палочки – подвержена регуляции со стороны ассоциативных микроорганизмов различных таксонов, которые действуют по направлениям: индифферентное, стимулирующее, ингибирующее и инвертирующее. Полученные данные свидетельствуют о том, что ассоцианты за счет способности регулировать биологические свойства микроорганизмов могут играть активную роль в процессах формирования и функционировании микробиоценозов [1–4]. Прикладные аспекты исследования АА в условиях межмикробных отношений состоят в использовании микробных стимуляторов бактериального антагонизма (МСБА) при разработке:

- новых и усовершенствования существующих про-, пре-, синбиотиков, БАД и функциональных продуктов питания, отличающихся от известных способностью стимулировать продукцию антимикробных веществ у определенных представителей индигенной микрофлоры индивидуума или пробиотических бактерий [3]. Наиболее перспективными для получения указанных биопрепаратов являются энтеро-, стрепто-, лакто- и стафилококки. В качестве ассоциантов-стимуляторов антагонизма могут быть использованы также лакто-, бифидо- и коринебактерии;
- новых поликомпонентных пробиотиков, состоящих из штамма-антагониста и ассоциативного штамма-стимулятора ростовых и / или антимикробных свойств антагониста [4]. Установлено, что ассоциации лакто-, бифидобактерий и *E. coli* с грампозитивными кокками, особенно *Enterococcus spp*., обладают большей АА, по сравнению с таковой монокультур;
- способа индивидуального подбора пробиотиков. Обнаруженная способность штаммов-пробиотиков усиливать защитный потенциал нормальной микрофлоры организма хозяина была использована при разработке указанного способа, заключающегося в выборе препарата, штаммы которого находятся в позитивных отношениях с нормальной микрофлорой и негативных с инфекционными агентами индивидуума [5];
- способов и продуктов для интенсификации выхода целевых продуктов антибиотиков. В биотехнологии при получении антибиотиков используют индукторы антибиотикопродукции – А-факторподобные вещества, например, бутиролактоны для *Streptomyces spp*. Аналогичное применение могут найти и МСБА.

Таким образом, проведенные фундаментальные исследования бактериального антагонизма в условиях межмикробных отношений позволили предложить новые механизмы формирования и функционирования микробиоценозов человека, направленные на поддержание колонизационной резистентности биотопа, через регуляцию защитных свойств доминантной микрофлоры ассоциативными микроорганизмами, а также позволили обосновать высокий практический и инновационный потенциал микробных стимуляторов бактериального антагонизма и способов их применения.

Работа выполнена в рамках темы НИР ИКВС УрО РАН «Формирование и функционирование микробных симбиозов в живых системах» (№ госрегистрации 01201067427) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 09-П-4-1007).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Семенов А.В*. Исследование роли чувствительных тест-культур в проявлении антагонизма бактериями-симбионтами человека // Саратовский научно-мед. журн. – 2011. – № 2. – С. 441–445.
2. *Семенов А.В.*, Черкасов С.В. Влияние ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий // Вестник Новосиб. гос. ун-та. Сер. Биол. клин. мед. – 2011. – Т. 9. № 3. – С. 20–26.
3. *Семенов А.В., Черкасов С.В.* Микробные стимуляторы бактериального антагонизма – новые противоинфекционные биопрепараты // Матер. Всерос. конф. “Инновации РАН – 2010”. – Казань, 2010. – С. 248–250.
4. *Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В*. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12. № 4. – С. 347–352.
5. *Семенов А.В.* Характеристика межмикробных отношений между пробиотическими и автохтонными микроорганизмами и алгоритм индивидуального подбора пробиотиков // Казанский мед. журн. – 2011. – Т. 92. № 6. – С. 790–797.

Semenov A.V.

APPLIED ASPECTS OF INVESTIGATIONS OF BACTERIAL ANTAGONISM IN CROSS-SPECIES INTERACTION BETWEEN MICROORGANISMS

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS,

Orenburg, Russia, lever3@yandex.ru

Summary. It was established that the antagonism of the predominant bacteria of normal human microflora (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*) could undergo changes in the interspecies interaction with associative microorganisms of various taxa. The novel mechanisms of formation and functioning of human microbiocenoses which support the biotope resistance due to the regulation of the protective properties of the predominant microflora by associative microorganisms were proposed. Furthermore, microbial stimulants of bacterial antagonism were characterized with regard to their significant innovative potential and applications.

Key words: interspecies interactions, antagonism, associative microorganisms, probiotics.

УДК 631.46(571.6)

Сидоренко М.Л.[1], Бузолева Л.С.[2]

ПОЧВЫ МОРСКИХ ПОБЕРЕЖИЙ КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ *LISTERIA MONOCYTOGENES* И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

[1]Учреждение Российской академии наук Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток, Россия, sidorenko@biosiol.ru;

[2]Государственное учреждение научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

Сибирского отделения РАМН, г. Владивосток, Россия, buzoleva@mail.ru

Резюме. Установлено, что абиотические характеристики почв морского побережья оказывают положительное влияние на сохранение и размножение в них патогенной микрофлоры. Этому способствует степень насыщенности основаниями, емкости катионного обмена, степень гумуссированности этих почв, а также штаммовые свойства самих бактерий.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes, Yersinia pseudotuberculosis*, размножение, почвы морских побережий, свойства.

Введение

В настоящее время не вызывает сомнения факт сапрофитного существования патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды. Особенный интерес в этом плане представляют возбудители сапрозоонозов, которые длительно выживают в почве и воде. К ним относятся *Listeria monocytogenes, Yersinia pseudotuberculosis*. Возможность существования патогенных листерий и иерсиний в различных почвах рассматривалась многими исследователями. Литвина и Г. П. Сомова (1988) [1] свидетельствуют о том, что не каждая почва является пригодной для обитания псевдотуберкулезного микроба и для него имеется своеобразная «почвенная очаговость». Анализ литературных данных показывает, что исследователи, как правило, рассматривали существование патогенных микроорганизмов в почве без учета химических, физико-химических характеристик последней. В связи с этим возникла необходимость в изучении абиотических факторов почв морского побережья, оказывающих влияние на рост и размножение в них листерий и иерсиний.

Материалы и методы исследования

В работе изучали образцы маршевой и маритимной почв (Приморский край, пос. Тавричанка, побережье залива Петра Великого), отобранные из верхнего (0-10 см) горизонта. В качестве объектов исследования использовали референтные штаммы *Listeria monocytogenes* (А, П, К, 10CN) и *Yersinia pseudotuberculosis* (282, 512, 907, 2781). Штаммы иерсиний получены из музея Всероссийского центра по иерсиниозам и псевдотуберкулезу (НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток), листерий – из ВГНКИ (г. Москва).

Результаты и обсуждение

В ходе наших экспериментов было установлено, что все исследуемые штаммы бактерий лучше всего размножались в маритимной почве, где их концентрация увеличивалась на 3,2 Lg. В маршевой почве наблюдалось менее интенсивное размножение бактерий, увеличение численности которых не превышало 1,6 Lg. При этом иерсинии в обоих типах почв размножались лучше, чем листерии. Кроме того, размножение листерий и иерсиний в почвах морского побережья зависело от индивидуальных особенностей штамма. Так, штамм «К» *L. monocytogenes* одинаково хорошо размножался как в маршевой, так и в маритимной почве. Штамм *Y. pseudotuberculosis* 2781 интенсивно размножался в маршевой почве, при этом в маритимной почве численность микроорганизмов резко снижалось и на восьмые сутки высевались единичные колонии.

Помимо индивидуальных особенностей штаммов бактерий на размножение листерий и иерсиний в почвах морского побережья оказывает влияние характеристика самих почв. По величине pH водной вытяжки видно, что маршевая почва является слабокислой (pH = 6,1), а маритимная - нейтральной (pH = 6,76). Слабокислая и нейтральная среды исследуемых почв благоприятны для размножения *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*. Именно поэтому маритимные почвы являются наиболее благоприятными для роста листерий и иерсиний.

Полученные результаты, а именно более активное размножение листерий и иерсиний в маритимной почве, объясняется тем, что маритимная почва имеет более высокие показатели степени насыщенности основаниями (87,35%), емкости катионного обмена (46,08%), чем маршевая почва (85,99 и 6,78 соответственно). Это указывает на то, что в маритимной почве более высокие концентрации ионов кальция и магния, которые являются необходимыми для нормального роста и размножения патогенных бактерий [2]. По содержанию обменных оснований маритимная почва (Ca^{2+} 31,2, Mg^{2+} 9,05 мг экв/100г почвы) превосходит маршевую (Ca^{2+} 3,74, Mg^{2+} 2,09 мг экв/100г почвы) .

Кроме того, содержание гумуса является одним из лимитирующих факторов при размножении патогенных бактерий в исследуемых почвах. Так, содержание гумуса маршевой почвы – 2,06%, маритимной – 5,43%. Поэтому нами также было исследовано влияние гумуса на размножение патогенных бактерий. Для чего были получены чистые препараты гуминовых кислот в виде гуматов аммония. Результаты опыта показали, что *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* достаточно хорошо размножались как на гуматах маритимной луговой почвы, так и на гуматах маршевой почвы, отдавая все же некоторое предпочтение гуматам, выделенным из маритимной луговой почвы.

Маршевая и маритимная почвы также различаются по количеству запасов легкорастворимых солей в слое 20 см – 1,87 кг/м^2 и 4,33 кг/м^2 соответственно. Общая порозность маршевой почвы – 76,1%, маритимной – 44,5%. Естественная влажность – 69,8% объема для маршевой почвы и 63,2% объема для маритимной почвы. Степень водонасыщенности – 92,6 и 85,5 соответственно. По содержанию физического песка и физической глины маршевые почвы оцениваются как связанно песчаные (сумма частиц > 0,01 мм (фракция физический глины) 96,1%), а маритимные легкоглинистые (55,5%).

Заключение

Таким образом, установлено, что абиотические характеристики почв морского побережья оказывают непосредственное положительное влияние на сохранение и размножение в них патогенной микрофлоры. Этому способствует степень насыщенности основаниями, емкости катионного обмена, степень гумуссированности этих почв, а также штаммовые свойства самих бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сомов Г.П., Литвин В.Ю*. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: экологические аспекты. – Новосибирск: Наука Сиб. отд-ие, 1988. – 208 с.

2. *Работнова И.Л., Позмогова И.Н*. Питание микроорганизмов. // Жур. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1993. – № 5. – С. 112–116.

Sidorenko M.L.[1], Byzoleva L.S.[2]

SOILS OF SEA COASTS AS *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* HABITAT

[1] Biology and Soil Science FEB RAS,
Vladivostok, Russia, sidorenko@biosiol.ru;
[2] SRI Epidemiology and Microbiology SB RAMS,
Vladivostok, Russia, buzoleva@mail.ru

Summary. The quantitative study of dynamics of a number of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* growth in soils of sea coast (mid-flight and maritime soils) was carried out. The investigated bacteria were well made multiple copies in all examined soils, preferring nevertheless maritime soil. Humus influence on duplication of pathogenic bacteria was also investigated. It was determined, that the humus content was one of the limiting factors under the duplication of pathogenic bacteria in soils under study. It was established, that abiotic characteristics of soils from the sea coast rendered direct positive effect on preservation and duplication of pathogenic microflora therein. This was promoted by a degree of a saturation by the bases, capacity exchange of cations, humus amount in these soils, and strain properties of bacteria.

Key words: *Listeria monocytogenes, Yersinia pseudotuberculosis*, reproduction, soil of sea coast, properties.

УДК 579.262

Соболева Ю.В.

ПОПУЛЯЦИОННО-КОММУНИКАТИВНЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ МИКРОСИМБИОЦЕНОЗОВ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, sjulia111@gmail.com

Резюме. Проведено исследование иерархической структуры микросимбиоценозов верхних дыхательных путей у клинически здоровых лиц и людей с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии. Выявлены отличия в составе симбионтов с разным уровнем коммуникативной активности в биотопах больных и здоровых обследуемых, а также особенности построения иерархической структуры в нормо- и патоценозах.

Ключевые слова: микробный биоценоз, коммуникативная активность, иерархическая структура.

Введение

Популяционно-коммуникативный подход при изучении микробных биоценозов включает оценку поведенческих реакций бактерий и позволяет построить иерархическую структуру в конкретном биотопе тела человека, что может дать возможность прогнозирования его стабильности и риска развития патологических состояний. Вместе с тем, в доступной литературе мы не нашли данных о строении иерархической структуры биоценозов ВДП в норме и при патологии. Цель настоящего исследования – изучение с помощью популяционно-коммуникативного подхода особенностей формирования микросимбиоценозов ВДП здоровых лиц и больных хроническим тонзиллитом.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужили 728 штаммов микроорганизмов, выделенных при обследовании биотопов слизистой оболочки миндалин (СОМ) и слизистой оболочки полости носа (СОН) клинически здоровых и больных хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии в возрасте от 19 до 23 лет. Забор материала проводили стерильным ватным тампоном утром, натощак. Сразу производили посев материала на 5% кровяной агар. Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили на основании общепринятых методов. У выделенных штаммов микроорганизмов изучали факторы патогенности и персистенции по общепринятым методикам. Для оценки модификации факторов патогенности использовали метод изучения изменчивости биологических свойств штаммов в условиях межмикробных взаимодействий. На основании активности микроорганизмов по модификации факторов патогенности и персистенции симбионтов в каждом микробиоценозе определяли иерархическую структуру [1].

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы исследованы 180 биоценозов: 90 биоценозов клинически здоровых лиц и 90 биоценозов людей больных хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии.

Для построения иерархической структуры в биоценозах определяли штаммы с высокой коммуникативной активностью, то есть штаммы, показатель активности при межмикробных взаимодействиях которых выше 0,80 баллов; со средней коммуникативной активностью (показатель активности при межмикробных взаимодействиях – от 0,01 до 0,79 баллов) и штаммы, не влияющие на факторы патогенности и персистенции.

При рассмотрении групп штаммов с различной коммуникативной активностью в биоценозах больных и здоровых лиц отмечено, что на СОН здоровых, по сравнению с больными, в 2,0 раза меньше штаммов со средней и 1,4 раза меньше штаммов с высокой коммуникативной активностью (10,9 и 21,0; 34,7 и 47,1% соответственно). Штаммы без коммуникативной активности, наоборот, в 1,7 раза чаще встречались у здоровых лиц (54,4 и 31,9%). На СОМ наблюдалась аналогичная картина: у здоровых, по сравнению с больными, в 1,9 раз чаще выделялись штаммы с высокой и средней коммуникативной активностью (31,0 и 57,8; 14,0 и 27,0% соответственно), штаммы без коммуникативной активности, наоборот, в 3,6 раза чаще обнаруживались у здоровых лиц (55,0 и 15,2%).

При сравнении двух биотопов (нос и миндалины) у здоровых и больных не выявлено различий в количестве штаммов, составляющих ту или иную группу по коммуникативной активности. У здоровых на СОН и СОМ количество штаммов с высокой, средней и с отсутствием коммуникативной активности было одинаково: с высокой – 34,7 и 31,0% соответственно, со средней – 10,9 и 14% соответственно, штаммы без коммуникативной активности – 55,0 и 54,4% соответственно. У больных на СОН и СОМ одинаковым было количество штаммов с высокой и средней коммуникативной активностью (47,1 и 57,8; 21,0 и 27,0% соответственно), штаммов с отсутствием коммуникативной активности, у больных было в 2 раза больше на СОН, по сравнению с СОМ (31,9 против 15,2%).

Заключение

Микробные ассоциации, составляющие микросимбиоценозы ВДП здоровых людей, характеризуются в большинстве случаев отсутствием влияния микроорганизмов на вирулентные и персистентные характеристики симбионтов, тогда как в микробных сообществах, населяющих биотопы ВДП больных, микросимбионты активно влияют на патогенный и персистентный потенциал друг друга. Это обстоятельство, возможно, способствует поддержанию и сохранению нормоценоза слизистых оболочек верхних дыхательных путей у здоровых лиц и, с другой стороны, формирует патологическую направленность в биотопах больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Хлопко Ю.А.* Структурно-функциональная характеристика микросимбиоценоза человека // Журн. микробиол. – 2009. – № 4. – С. 4–8.

Soboleva J.V.

POPULATION-COMMUNICATIVE APPROACH IN STUDYING THE UPPER RESPIRATORY TRACT MICROSYMBIOCONOSES IN HEALTH AND PATHOLOGY

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis,
UB RAS, Orenburg, Russia, sjulia111@gmail.com

Summary. The hierarchical structure of the upper respiratory tract microsymbiocenoses in persons with chronic tonsillitis and healthy ones was studied. Differences in composition of symbionts with different levels of communicative activities in biotopes of sick and healthy patients, and peculiarities of building of a hierarchic structure in healthy and pathologic biocenoses have been revealed.

Key words: microbial biocenosis, communicative activity, hierarchical structure.

УДК 615.015.8

Столбова М.Г., Несчисляев В.А.

К ВОПРОСУ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОРБЕНТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Филиал Федерального государственного унитарного предприятия

«Научно-производственное объединение «Микроген» Минздравсоцразвития России в г. Пермь;

«Пермское научно-производственное объединение «Биомед», Пермь, Россия, neschislayew@gmail.com

Резюме. Изучена возможность использования гомогената бурых водорослей в качестве сорбента для пробиотических микроорганизмов. Апробированы варианты иммобилизации бифидобактерий, исследована их устойчивость к действию желудочного сока и желчи, выявлены высокие протективные свойства сорбента на основе бурых водорослей. Показано, что гомогенат бурых водорослей перспективен для производства пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

Ключевые слова: пробиотики, сорбент, иммобилизация.

Воздействие неблагоприятных экологических, технологических и социальных факторов, а также повсеместное и плохо контролируемое применение антибактериальных средств негативно отражается на микроэкологическом статусе человека, что выражается в широком распространении дисбиозов среди детского и взрослого населения [1]. Общепринятая терапевтическая практика восстановления нормальной микрофлоры макроорганизма основана на комплексном использовании различных препаратов, включая пробиотики, активность которых снижается из-за бактерицидного действия желудочного сока и желчи. Одним из общепризнанных направлений повышения эффективности пробиотиков является конструирование препаратов на основе иммобилизованных на различных сорбентах бактерий производственных штаммов, что позволяет защитить клетки от бактерицидного воздействия пищеварительных соков. Поиск и апробация новых вариантов иммобилизации клеток является актуальной задачей [2, 3, 4].

Объектами исследования были образцы лиофилизированной биомассы бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей (ламинария, фукус) и ферментированных отрубях, препарат «Бифидумбактерин форте» (ЗАО «Партнер», Россия), содержащий угольный сорбент. Для сравнения использовали препарат с неиммобилизованными клетками «Бифидумбактерин сухой» (ФГУП НПО «Микроген», Россия). При моделировании условий пищеварения применяли искусственный желудочный сок следующего состава: пепсина 3 г, кислоты соляной концентрированной 6 мл, воды очищенной до 1 л, а также желчь медицинскую консервированную. Регидратированные образцы сухой биомассы и препаратов инкубировали при 37^{0}С в присутствии желудочного сока в течение 15 минут, в присутствии желчи – в течение 30 минут, контрольные образцы – в 0,9% растворе натрия хлорида. Для определения показателя КОЕ до и после окончания инкубации отбирали по 1 мл бактериальной взвеси и высевали в среду Блаурокка (десятикратные разведения) с последующим подсчетом выросших колоний.

Установлено, что количество жизнеспособных бифидобактерий в образцах иммобилизованной биомассы и в препарате «Бифидумбактерин сухой» до добавления желудочного сока и желчи составляло не менее 107 КОЕ/мл., а в контрольном образце «Бифидумбактерина форте» – 105 КОЕ/мл. После инкубации в присутствии желудочного сока отмечено снижение показателя КОЕ/мл на 2-3 порядка в образцах бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей и активированном угле. Стоит отметить, что после действия желудочного сока количество жизнеспособных бифидобактерий в образцах с сорбентом на основе бурых водорослей сохраняется на уровне 105-106, тогда как в «Бифидумбактерине форте» снижается до 103. Значительное изменение выживаемости наблюдалось в образцах с неиммобилизованными клетками («Бифидумбактерин сухой») и в биомассе бифидобактерий, иммобилизованных на ферментированных отрубях – показатель КОЕ/мл снижался на 5 порядков. Контакт с желчью в течение 30 минут снижал показатель КОЕ/мл на 2-3 порядка в образцах иммобилизованных и свободных клеток (таблица).

Протективные свойства сорбента на основе фукуса и ламинарии можно объяснить присутствием в гомогенате бурых водорослей альгинатов. Попадая в желудочно-кишечный тракт, альгинаты, содержащиеся в иммобилизованной биомассе, взаимодействуют с соляной кислотой желудочного сока и образуют изотропный гель с включенными в него иммобилизованными клетками бифидобактерий. Образованная «гелевая капсула» предохраняет клетки от дальнейшего воздействия соляной кислоты и пепсина желудочного сока и тем самым способствует сохранению их жизнеспособности. В тонком кишечнике происходит растворение геля и высвобождение бифидобактерий. Сорбент на основе активированного угля таким свойством не обладает.

Таблица.

Устойчивость бифидобактерий к действию желудочного сока и желчи

Образец	Сорбент	Контроль (физ. р-р)	Желудочный сок, экспозиция 15 мин при 37ОС	Желчь, экспозиция 30 мин при 37ОС
Био-масса 1	Фукус	2,10(±0,12) × 108	1,27(±0,20) × 106	5,05(±0,39) × 106
Биомасса 2	Ламина-рия	1,80(±0,05) × 108	1,57(±0,50) × 106	2,80(±0,44) × 106
Биомасса 3	Ферменти-рованные отруби	1,65(±0,09) × 108	0,50(±0,67) × 103	1,30(±0,40) × 105
Бифидум-бактерин форте	Активи-рованный уголь	8,00(±0,09) × 105	3,25(±0,04) × 103	3,50(±0,24) × 103
Бифидум-бактерин сухой	-	3,23(±0,01) × 107	1,15(±0,12) × 102	4,50(±0,31) × 105

Таким образом, результаты экспериментов подтверждают, что желудочный сок и желчь оказывают сильное негативное влияние на количество жизнеспособных бифидобактерий. Иммобилизованные на гомогенате бурых водорослей бактериальные клетки более резистентны к воздействию биологических жидкостей. Сорбенты на основе бурых водорослей можно считать перспективными для производства пробиотических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барановский А.Ю., Кондрашина Э.А.* Дисбактериоз кишечника. 3-е изд. (Серия «Краткое руководство»). – СПб.: Питер, 2008. – 240 с.

2. *Бондаренко В.М.* О совершенствовании пробиотических препаратов // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2008. – № 2-3. – С. 24.

3. *Болотов В.Д. Чупринина Р.П., Мацулевич Т.В., Дорошенко Е.О., Ладыгина А.В.* Сорбированные Пробиотики. Перспективы развития // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции “Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней”. – 2008. – С. 27.

4. *Корочинский А.В., Верниковский В.В., Степанова Э.Ф.* Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 5. – С. 34–38.

Stolbova M.G., Neschislayew V.A.

REVISITED APPLICATION OF SORBENTS IN PROBIOTIC PREPARATION PRODUCTION

«Biomed» – Perm Branch of the Federal State Unitary Company

«Microgen» of the Ministry of Health and Social Development of

the Russian Federation, Perm, Russia, neschislayew@gmail.com

Summary. The possibility of brown algae homogenate application as a sorbent for probiotic microorganisms was studied. Variants of bifidobacteria immobilization were tested, and their resistance to gastric juice and bile action was investigated. The work revealed high protective properties of the sorbent on the basis of brown algae and their homogenate was demonstrated as a promising sorbent for the production of probiotic preparations on the basis of immobilized cells.

Key words: probiotics, sorbent, immobilization.

УДК 57.088.6+615.322

Стукова Г.И.[1], Куюкина М.С.[1,2], Ившина И.Б.[1,2]

АНТИАДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ *RHODOCOCCUS*-БИОСУРФАКТАНТА В ОТНОШЕНИИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, pluma@yandex.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, kuyukina@mail.ru

Резюме. Изучена антиадгезивная активность *Rhodococcus*-биосурфактанта в отношении представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий. Установлено, что биосурфактант не оказывает ингибирующего действия на развитие тестируемых бактериальных культур, но подавляет их клеточную адгезию к поверхности полистирольных планшетов. Выявлено понижение антиадгезивного эффекта биосурфактанта в ряду бактериальных видов: *Bacillus subtilis* > *Escherichia coli* > *Micrococcus luteus* > *Pseudomonas fluorescens* > *Arthrobacter simplex* > *Brevibacterium linens*. Подобраны оптимальные (10–100 мкг/мл) концентрации биосурфактанта, способствующие 30–76%-ому уменьшению степени адгезии бактериальных клеток к твердой поверхности.

Ключевые слова: бактериальная адгезия; антиадгезивная активность; *Rhodococcus*-биосурфактант.

Введение

В настоящее время поверхностно-активные вещества биогенного происхождения (биосурфактанты), наряду с традиционным применением в качестве детергентов и эмульгаторов, привлекают внимание исследователей как возможные агенты биомедицины. Широкое использование в медицинской практике разнообразных катетеров, имплантантов, протезов и т.п. обусловило необходимость разработки эффективных методов подавления адгезии бактериальных клеток на их поверхности для предотвращения формирования биопленок, которые снижают эффективность и срок службы данных устройств [1]. В плане биомедицинского применения сегодня интенсивно изучаются биосурфактанты гликолипидной природы, представляющие собой комплексы на основе моно- и дисахаров, соединенных посредством сложноэфирной связи с жирными кислотами (рамнолипиды псевдомонад, маннозилэритритол- и софоролипиды дрожжей) [2]. Ранее было показано [3], что гликолипидный биосурфактант, синтезируемый актинобактериями рода *Rhodococcus*, проявляет антиадгезивную активность в отношении моноцитов периферической крови, подавляя их адгезию к полистирольным планшетам, однако исследование влияния биосурфактанта на адгезивные свойства бактерий не проводилось. Цель настоящей работы – изучение антиадгезивной активности *Rhodococcus*-биосурфактанта в отношении представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы исследования

В работе использовали культуры грамположительных бактерий *Arthrobacter simplex* ИЭГМ 667, *Bacillus subtilis* ATCC 6613, *Brevibacterium linens* ИЭГМ 1830, *Micrococcus luteus* ИЭГМ 401 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WFCC# 768, www.iegm.ru/iegm.col), а также грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* K-12 и *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 9046. Выделение гликолипидного биосурфактанта, синтезируемого клетками родококков, проводили путем экстрагирования метил-трет-бутиловым эфиром [4]. Антиадгезивную активность биосурфактанта исследовали с использованием 96-луночных полистирольных планшетов («Медполимер», Санкт-Петербург). Изопропаноловые растворы биосурфактанта вносили в лунки планшетов в концентрации 0,1–1000 мг/мл; в контрольные лунки не добавляли биосурфактант. Микропланшеты высушивали в стерильных условиях в течение 12 ч. Тестируемые бактериальные культуры, выращенные на МПА при 28°С в течение 2 сут, суспендировали в 0,5% NaCl (ОП$_{600нм}$=0,1) и вносили в лунки планшетов с предварительно добавленным МПБ. Планшеты инкубировали на шейкере Titramax 1000 (Heidolph-Instruments, Германия) при 28ºС, 160 об/мин в течение 3 сут. Оптическую плотность бактериальных культур определяли на микропланшетном фотометре Multiscan Ascent («Thermo Electron Corporation», Финляндия) при 630 нм. Прикрепленные клетки дважды отмывали буфером следующего состава (г/л): Na2HPO4•12H2O – 8,9; KH2PO – 3,39 с использованием микропланшетного вошера Star Fax® 2600 («Awareness Technology Inc.», США). Адгезированные бактериальные клетки окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового (хч, «Реахим», Пермь) в течение 20 мин, затем дважды отмывали буфером. Краситель экстрагировали смесью ацетон/этанол (1:4) на микропланшетном шейкере при 900 об/мин в течение 5 мин, после чего измеряли оптическую плотность экстракта при 405 нм. Степень адгезии вычисляли по формуле: $A_{405нм}/A_{630нм}\times100\%$, где $A_{630нм}$ – оптическая плотность бактериальной культуры, $A_{405нм}$ – оптическая плотность адгезированных бактериальных клеток.

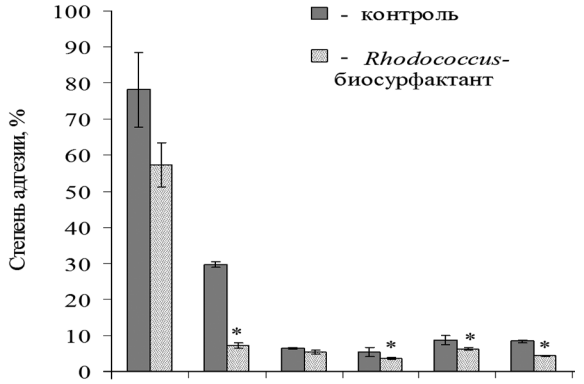


Рисунок 1. Антиадгезивная активность *Rhodococcus*-биосурфактанта в отношении тестируемых культур: 1 – *A. simplex* ИЭГМ 667; 2 – *B. subtilis* ATCC 6613; 3 – *B. linens* ИЭГМ 1830; 4 – *M. luteus* ИЭГМ 401; 5 – *P. fluorescens* NCIMB 9046; 6 – *E. coli K-12.*
*Различия средних данных для контрольного и опытного вариантов достоверны при уровне значимости p<0,05.

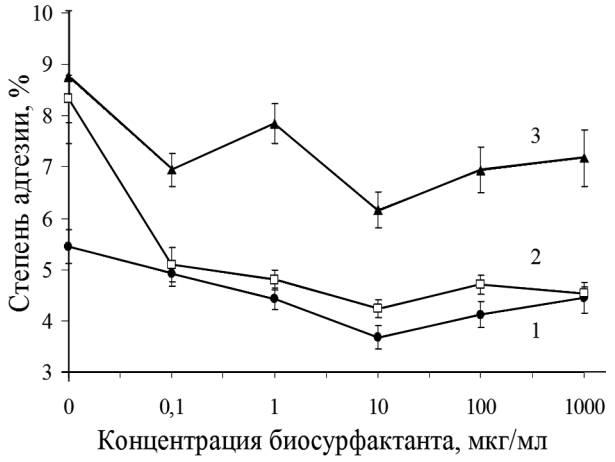


Рисунок 2. Зависимость степени адгезии тестируемых бактерий к твердой поверхности от концентрации вносимого *Rhodococcus*-биосурфактанта.
Исследуемые культуры: 1 – *M. luteus* ИЭГМ 401; 2 – *E. coli* K-12; 3 – *P. fluorescens* NCIMB 9046.

Результаты и обсуждение

По нашим данным, *Rhodococcus*-биосурфактант не оказывал ингибирующего воздействия на развитие тестируемых бактериальных культур и, в единичном случае (в отношении *M. luteus* ИЭГМ 401), проявлял ростостимулирующий эффект. Как видно из рисунка 1, клетки грамположительных бактерий *A. simplex* ИЭГМ 667 и *B. subtilis* ATCC 6613 характеризовались высокой (78 и 30% соответственно), а грамотрицательных *P. fluorescens* NCIMB 9046 и *E. coli* K-12 – сравнительно низкой (9 и 8% соответственно) степенью адгезии к полистирольным

планшетам. Пониженную адгезивную активность к твердой поверхности проявляли клетки *M. luteus* ИЭГМ 401, что, по-видимому, обусловлено их кокковидной формой.

Внесение *Rhodococcus*-биосурфактанта в лунки планшетов подавляло процесс клеточной адгезии всех исследованных бактериальных культур (см. рисунок 1) При этом наиболее выраженное антиадгезивное воздействие биосурфактанта выявлено для представителей *B. subtilis* и *E. coli* (степень адгезии снижалась на 76 и 49% соответственно). Под действием биосурфактанта адгезивная активность псевдомонад и микрококков уменьшалась на 30–32%, артробактерий – на 27%, бревибактерий – на 17%.

Нами установлена концентрационная зависимость антиадгезивной активности *Rhodococcus*-биосурфактанта в отношении тестируемых бактерий. Как видно из рисунка 2, исследуемый препарат в концентрации 10 мкг/мл на 30–50% ингибировал адгезионный процесс клеток *P. fluorescens* NCIMB 9046, *E. coli* К-12 и *M. luteus* ИЭГМ 401. В то же время, для эффективного (на 17-76%) подавления клеточной адгезии *A. simplex* ИЭГМ 667, *B. subtilis* ATCC 6613 и *B. linens* ИЭГМ 1830 оказалось необходимым внесение более концентрированного (100 мкг/мл) препарата биосурфактанта.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования антиадгезивной активности *Rhodococcus*-биосурфактанта в отношении широкого спектра микроорганизмов.

Исследование выполнено при поддержке грантов Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-64403.2010.4, РФФИ-р_урал_а № 11-04-96045, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (номер гос. регистрации 01200963677) и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (государственный контракт № 16.518.11.7069).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rodrigues L., van der Mei H. C., Teixeira J., Oliveira R.* Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 63. P. 4408–4410.

2. *Kitamoto D., Isoda H., Nakahara T.* Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers // J. Biosc. Bioengin. – 2002. – V. 94. P. 187–201.

3. *Gein S.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Baeva T.A., Chereshnev V.A.* In vitro cytokine stimulation assay for glycolipid biosurfactant from *Rhodococcus ruber*: role of monocyte adhesion // Cytotechnology. – 2011. DOI 10.1007/s10616-011-9384-3.

Stukova G.I.[1], Kuyukina M.S.[1,2], Ivshina I.B.[1,2]

ANTIADHESIVE ACTIVITY OF *RHODOCOCCUS* BIOSURFACTANT AGAINST GRAM NEGATIVA AND GRAM POSITIVE BACTERIA

[1]Perm State University, Perm, Russia, pluma@yandex.ru;
[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, kuyukina@mail.ru

Summary. Anti-adhesive activity of *Rhodococcus*-biosurfactant towards various gram-positive and gram-negative bacteria was studied. It was shown that the biosurfactant demonstrated a lack of growth inhibitory activity but inhibited bacterial adhesion to a solid surface. The reduction of the anti-adhesive effect of biosurfactant in the range of bacterial species was revealed: *Bacillus subtilis* > *Escherichia coli* > *Micrococcus luteus* > *Pseudomonas fluorescens* > *Arthrobacter simplex* > *Brevibacterium linens*. The optimal concentrations (10-100 mg/ml) of biosurfactant contributing to 30-76% reduction in the adhesion of bacterial cultures studied.

Key words: bacterial adhesion; anti-adhesive activity; *Rhodococcus*-biosurfactant.

УДК 579.238.7

Сыроегин Е.А.[1], Петрова О.Е.[2], Горшков В.Ю.[2], Сузина Н.Е.[3], Даминова А.Г.[2], Гоголев Ю.В.[2]

ОСОБЕННОСТИ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ГОЛОДАНИЕМ, ФИТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* ШТАММ SCRI 1043

[1]Федеральное государственное автономное образовательного учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, dydanka@gmail.com;
[2]Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научно центра РАН, г. Казань, Россия, poe60@mail.ru;
[3]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия, suzina_nataliya@rambler.ru

Резюме. Было выяснено, что голодающие культуры *Erwinia carotovora atroseptica* более устойчивы к воздействию рифампицина и температурного шока, чем культуры поздней экспоненциальной фазы роста (14-16 ч), росшие на богатой питательной среде LB (Luria-Bertani). Кроме того, микрофотографии срезов голодающих клеток позволяют судить о наличии в клетках включений поли-бета-оксимасляной кислоты , гликогена и полифосфатов.

Ключевые слова: стрессоустойчивость, запасные питательные вещества.

В естественной среде бактерии подвергаются многочисленным и различным стрессам. От способности адаптироваться к стрессовым условиям зависит выживание микроорганизма в, зачастую, жестких условиях среды. Изучение особенностей выживания патогенных микроорганизмов вне организма хозяина представляется актуальным с точки зрения контроля над распространением инфекций. Нами были изучены некоторые особенности стресса, вызванного голоданием, у фитопатогенной энтеробактерии *Erwinia carotovora atroseptica* SCRI 1043, а именно: отношение голодающих культур к воздействию других стрессоров (высокая температура, воздействие антибиотиков) и образование запасных питательных веществ, поскольку известно, что метаболизм запасных веществ у некоторых организмов сопряжен со стрессоустойчивостью. Популяции микроорганизмов представляют собой гетерогенные структуры, состоящие из различных по физиологическим параметрам клеток. Для голодающих популяций описаны некоторые морфофизиологические варианты клеток, характеризующиеся в том числе повышенной стрессоустойчивостью. Первый тип клеток, названый жизнеспособные, но некультивируемые, утрачивает колониеобразующую способность на универсальных питательных

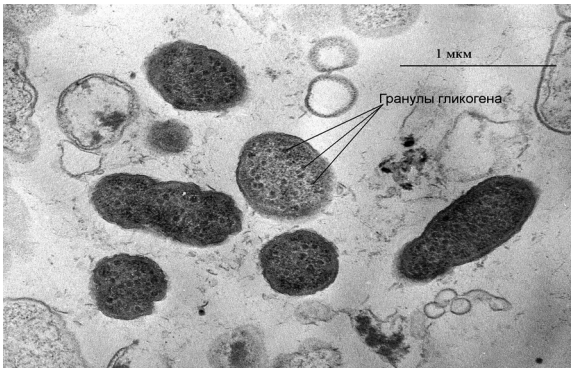


Рис. 1. Микрофотография срезов клеток *E. carotovora atroseptica*. Клетки, инкубированные в течение 4 суток в АВ, гликоген, размеры клеток редуцированы.

средах; после процедур «оживления» эта способность восстанавливается. Второй тип клеток – цистоподобные покоящиеся клетки – характеризуется комплексом ультраструктурных преобразований, связанных, в частности, с формированием многослойной капсулы. Третий тип клеток – персистеры – имеет низкий пролиферативный потенциал и отличается устойчивостью к антибиотикам. В голодающих бактериальных популяциях *E. carotovora atroseptica* SCRI 1043 преобладают клетки, имеющие округлую форму, редуцированный размер, электронно-плотной гетерогенную цитоплазму, появляются покоящи-

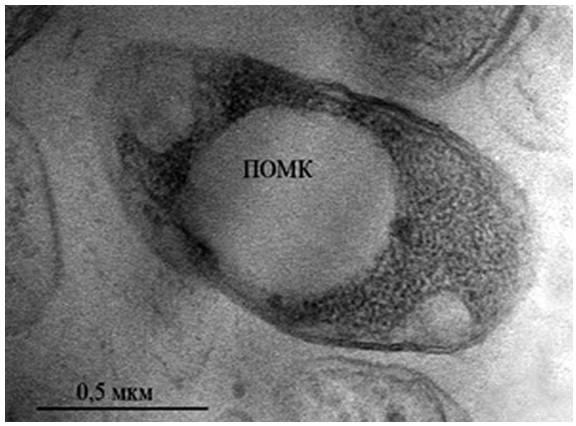


Рис. 2. Микрофотография срезов клеток *E. carotovora atroseptica*. Клетки инкубированные в течение 4 суток в АВ, ПОМК.

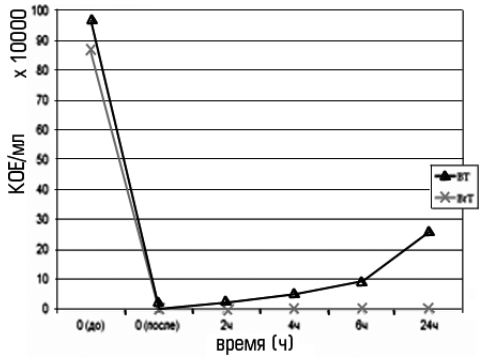


Рис. 3. Действие температурного шока на ВТ – клетки *E. carotovora* atroseptica, голодающие на безуглеродной среде АВ; ВгТ – клетки *E. carotovora atroseptica*, инкубированные на полноценной среде LB.

еся клетки второго типа, у которых формируются дополнительные поверхностные покровы в виде фибриллярной капсулы. У части популяции наблюдаются признаки автолиза, что, по всей вероятности, создает предпосылки для накопления запасных веществ у жизнеспособных клеток. На микрофотографиях срезов клеток голодающей популяции мы наблюдали гранулы запасных веществ: поли-бета-оксимасляной (ПОМК) кислоты, гликогена (рис. 1, 2).

Один стрессор может вызывать последующую устойчивость к другим стрессорам [1]. Сразу после действия повышенной температуры (50°5 мин) численность жизнеспособных клеток *E. carotovora atroseptica*, выросших на голодной среде АВ, снижалась до минимальных значений, затем постепенно возрастая и доходя до плотности популяции около 105 КОЕ/мл через 24 ч (рис. 3). Вегетативные клетки, выросшие на полноценной питательной среде, после воздействия температурного шока необратимо теряли способность образовывать колонии на твердых средах, что связано, вероятно, с их гибелью, а не с переходом в некультивируемое состояние. Внимания заслуживает устойчивость голодающих бактериальных культур к антибиотикам, приводящая к рецидивам после медикаментозного лечения. Было по-

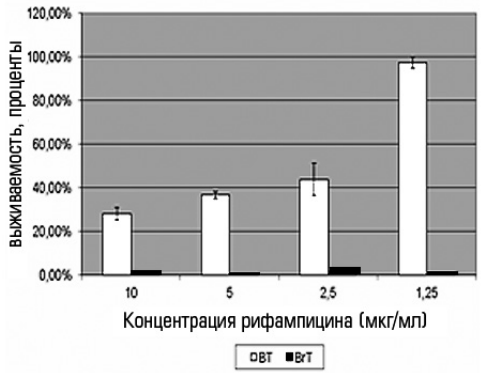


Рис. 4. Действие рифампицина на бактерию *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*: ВТ – клетки, голодающие на безуглеродной среде АВ; ВгТ – вегетативные клетки, инкубированные на полноценной среде LB

казано, что голодающие клетки *E. carotovora atroseptica* существенно более устойчивы к воздействию рифампицина, чем вегетативные клетки (рис. 4). Таким образом, в процессе голодания у фитопатогенной энтеробактерии *E. carotovora atroseptica* SCRI 1043 формируется совершенно особая морфофизиологическая структура популяции, позволяющая успешно персистировать в условиях межвегетационного периода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баснакьян И.А.* Стресс у бактерий. – Москва: Медицина, 2003. – 136с.

Syroegin E.A.[1], Petrova O.E.[2], Gorshkov V.J.[2], Suzina N.E.[3], Daminova A.G.[2], Gogolev Yu.V.[2]

CHARACTERISTICS OF STRESS CAUSED BY STARVATION IN PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* STRAIN SCRI 1043

[1]Kazan Federal University, Kazan, Russia, dydanka@gmail.com;
[2]Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Centre, Kazan, Russia, poe60@mail.ru;
[3]G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Russia, suzina_nataliya@rambler.ru

Summary. It was found that starving bacterial cultures *Erwinia carotovora atroseptica* are more resistant to rifampicin and short-term temperature shock than the cultures in late exponential growth phase. In addition, the photomicrographs of the cells sections obtained by starving cultures give a evidence of the presence of the granules of storage compounds in the cells, such as a glycogen and a poly-beta-hydroxybutyric acid.

Key words: stress resistance, storage compounds.

УДК 579.22; 579.083.13

Сырых Э.В., Волкова А.В., Яковлева Г.Ю., Волошин А.В., Крушельницкий А.Г., Куриненко Б.М.

НАРУШЕНИЕ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* 2,4,6 ТРИНИТРОТОЛУОЛОМ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, Yakovleva_Galina@mail.ru

Резюме. С использованием метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) спектроскопии ядер ^{31}P было показано увеличение подвижности фосфолипидов мембран клеток *Escherichia coli*, находящихся в контакте с 2,4,6-тринитротолуолом (ТНТ) (200 мг/л). Такое изменение привело к нарушению ионного гомеостаза в клетках. Увеличение соотношения Ca/K в 3 раза дало основание предположить, что под действием ТНТ клетки *E. coli* переходят в гипометаболическое состояние.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), фосфолипиды, ^{31}P ЯМР-спектроскопия, ионный гомеостаз.

Токсический эффект 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ), трудноразлагаемого нитроароматического соединения, связан не только с присутствием в среде культивирования ксенобиотика и (или) продуктов его микробной трансформации, но и с внеклеточной аккумуляцией активных форм кислорода (АФК), образующихся на первом этапе его трансформации [1]. Благодаря высокой реакционной способности, АФК могут повреждать все биологические макромолекулы (нуклеиновые кислоты, белки и липиды) и представляют потенциальную опасность для клетки [2]. Целью данной работы является оценка

структурно-метаболических изменений в клетках *Escherichia coli*, культивированных в присутствии ТНТ, в частности, мембранных структур клеток.

Чтобы оценить состояние мембраны, в состав которой входят фосфолипиды, использовали ЯМР-спектроскопию ядер ^{31}P. Были получены спектры ^{31}P интактных клеток *E. coli* AB1157, культивируемых в течение четырех часов на синтетической среде M9 в присутствии ТНТ (200 мг/л). На спектрах видны линии, относящиеся к фосфолипидам, АТФ, а также два пика боковых линий от вращения под магическим углом, появляющиеся в результате недостаточного усреднения тензора анизотропии химического сдвига ядер ^{31}P в фосфолипидах. Интенсивность пика, характеризующего АТФ, снижается под действием ТНТ по сравнению с контрольным вариантом, что, скорее всего, связано со снижением пула восстановленных эквивалентов и скорости утилизации глюкозы в присутствии ТНТ, о котором сообщалось ранее для *E. coli* K12 [3]. Форма пиков фосфолипидов контрольного и опытного вариантов различается. Пик фосфолипидов контрольного варианта имеет сложную несимметричную форму. Этот пик можно представить как сумму двух симметричных узких пиков. Спектор фосфолипидов опытного образца состоит из одного пика, находящегося между двух пиков спектра контрольного образца. С точки зрения теории ЯМР-спектроскопии [4] переход от двух пиков к одному можно объяснить двумя причинами: изменением гетерогенности мембраны (статическое усреднение) и динамическим усреднением. Вероятнее всего, под действием ТНТ мембрана сохраняет свою гетерогенность, но липиды приобретают большую подвижность. За счет увеличения молекулярной подвижности происходит усреднение химического сдвига в течение времени эксперимента, то есть за время спада намагниченности при записи одного спектра, что, в свою очередь, приводит к появлению одного пика вместо нескольких.

Изменение в мембране под действием ТНТ может повлечь за собой нарушение ее транспортных функций и, как следствие, изменение ионного гомеостаза. Поэтому мы определили изменение элементного состава клеток *E. coli* под воздействием ТНТ. Из 16 исследованных элементов концентрации Na, B, Mo, Zn, Ba, Li в клетке под действием ТНТ не изменялись и находились на уровне клеток контрольного варианта. Концентрация Ca увеличилась в 1,5 раза, а K и Mg снизилась в среднем в 2 раза по сравнению с их концентрациями в клетках контрольного варианта. Под действием ТНТ увеличивается количество микроэлементов. Так концентрация Pb возрастает в 6 раз, Al - в 3 раза, Mn - в 5 раз. Аналогичные данные были получены и при переходе клеток *E. coli* K12 в гипометаболическое состояние под действием голодания [5]. Важным маркерным показателем гипометаболизма служит увеличение соотношения Ca/K [6]. Под действием ТНТ это соотношение увеличивается в 3 раза. Следовательно, можно предположить, что клетки в присутствии ТНТ находятся на начальном этапе перехода в гипометаболическое состояние.

Следовательно, внесение в среду культивирования ТНТ вызывает нарушение мембраны клеток *E. coli* AB1157, которое проявляется в изменении подвижности фосфолипидов, что в свою очередь приводит к нарушению ионного гомеостаза и началу перехода клеток в гипометаболическое состояние.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Науменко Е.А., Наумов А.В., Суворова Е.С., Герлах Р., Зиганшин М.А., Ложкин А.П., Силкин Н.И., Наумова Р.П.* Участие кислорода в бактериальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола // Биохимия. – 2008. – Т. 739. № 4. – С.463–469.

2. *Storz G., Imlay J.A.* Oxidative stress // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – V. 2. – P. 188–194.

3. *Куриненко Б.М., Дениварова Н.А., Яковлева Г.Ю.* Чувствительность различных штаммов *Escherichia coli* к токсическому действию 2,4,6-тринитротолуола // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. N. 1. – С.53–57.

4. *Sandström J.* Dynamic NMR Spectroscopy. – London: Academic Press, 1982. – P. 226.

5. *Маргулис А.Б., Волошин А.В., Гильмутдинов А.Х., Колпаков А.И., Ильинская О.Н.* Изменение функциональной активности бактериальной клетки сопряжено с изменением её элементного состава // Доклады академии наук. – 2009. – Т. 427. N. 4. – С.553–556.

6. *Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Воробьева Е.А., Эль-Регистан Г.И.* Сравнительное изучение элементного состава вегетативных и покоящихся клеток микроорганизмов // Микробиология. – 2002. – Т. 71. N. 6. – С. 37–48.

Syryh E.V., Volkova A.V., Yakovleva G. Yu., Voloshin A.V., Krushelnitskij A.G., Kurinenko B.M.

THE INFRINGEMENT OF *ESCHERICHIA COLI* CELL MEMBRANE STRUCTURES BY 2, 4, 6-TRINITROTOLUENE

Kazan (Privolzhsky) Federal University,

Kazan, Russia, Yakovleva_Galina@mail.ru

Summary. With use of the method of 31P nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, the increase of mobility of the phospholipids from the membranes of *Escherichia coli* cells, being in contact with 2,4,6-trinitrotoluene (THT) (200 mg/l), has been shown. Such change led to infringement of an ionic homeostasis in cells. The increase of the Ca/K ratio in 3 times given the reason to assume, that the E. coli cells turn to hypometabolic condition under the influence of THT.

Key words: *Escherichia coli*, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), phospholipids, ^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, an ionic homeostasis.

УДК 579.822.42:577.121.2

Трубицын И.В.[1], Андреевских Ж.Г.[1], Баркалова Е.В.[1], Антипов А.Н.[2]

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИССИМИЛЯЦИОННОЙ НИТРАТРЕДУКЦИИ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *THIOTHRIX*

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Россия, tru.ivan@mail.ru;

[2]Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия

Резюме. Впервые для представителей рода *Thiothrix (Thiothrix* sp. штамм AS*, T. unzii, T. eikelboomii, T. caldifontis* штамм G1 *и T. lacustris* штамм BL) была показана способность к анаэробному дыханию на нитратах. Установлено, что процесс диссимиляционной нитратредукции сопряжён с окислением восстановленных соединений серы. Для *Thiothrix* sp. штамм AS показано наличие гена *narG*, кодирующего альфа-субъединицу мембраносвязаной респираторной нитратредуктазы. Выявлена экспрессия данного гена при культивировании бактерий в анаэробных условиях. У ряда штаммов измерена суммарная активность нитратредуктаз при аэробном и анаэробном культивировании. Произведена неполная очистка мембраносвязаной нитратредуктазы *NarGHI*. Изучен ряд физико-химических свойств данного фермента.

Ключевые слова: нитратредуктаза, аэробное и анаэробное культивирование, диссимиляционная нитратредукция.

Для представителей рода *Thiothrix* способность к диссимиляционной нитратредукции ранее не была показана. Однако наши исследования указывают на возможность этого процесса у подавляющего большинства представителей этого рода. Этот процесс имеет глубокий экологический адаптационный смысл – местообитание представителей рода *Thiothrix* характеризуется регулярным суточным ритмом смены аэробно-анаэробного режима в приливно-отливной зоне литорали или в протоке воды с высоким содержанием сульфида.

В ходе выполнения данной работы нами был изучен процесс анаэробного роста у пяти представителей рода *Thiothrix: T. unzii, T. eikelboomii, Thiothrix sp.* штамм AS, *T. caldifontis* штамм G1 и *T. lacustris* штамм BL. Установлено, что у всех изучаемых организмов помимо восстановления NO_3- до NO_2- имеет место процесс дальнейшего восстановления нитритов до аммония. Однако интенсивность данного процесса различна у разных штаммов. Через 120 ч экспозиции количество аммония в среде по отношению к количеству восстановленного нитрата составляет от 11% у штамма AS до 67% у *T. eikelboomii*. У изучаемых организмов процесс восстановления нитрата сопряжен с окислением восстановленных соединений серы, в частности тиосульфата (рис. 1).

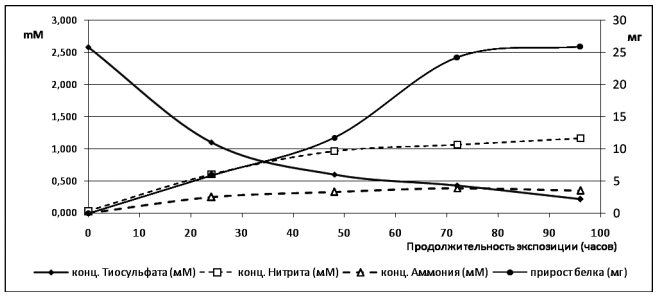


Рис. 1. Динамика восстановления нитрата, сопряженного с окислением тиосульфата.

Для *Thiothrix sp*. штамм AS выявлено наличие гена *narG*, кодирующего альфа-субъединицу мембраносвязаной респираторной нитратредуктазы. Анализ нуклеотидной последовательности гена *narG* показал высокий процент гомологии с другими прокариотами: 74% с *Chromohalobacter salexigens*, 73% с *Marinobacter aquaeolei* и 71% с *Enterobacter cloacae*. У штамма AS была выявлена экспрессия гена *narG* при анаэробном культивировании. При росте в аэробных условиях экспрессия гена не была отмечена.

Измерена суммарная активность нитратредуктаз при аэробном и анаэробном культивировании у видов *T. unzii, T. eikelboomii, T. lacustris* штамм BL, *T. caldifontis* штамм G1 и *Thiothrix* sp. штамм AS (таблица). У всех изучаемых представителей рода *Thiothrix* активность нитратредуктаз в пересчёте на биомассу значительно выше при росте в анаэробных условиях.

У *Thiothrix* sp. штамм AS получен препарат частично очищенной респираторной нитратредуктазы *NarGHI*. С его помощью изучен ряд физико-химических характеристик фермента. Температурный оптимум данной нитратредуктазы составил 63°С. Показано, что pH оптимум фермента зависит от вещества, используемого в качестве донора электронов. Он составил 7,2 – 7,3 с использованием метилвиологена, 6,0 – 6,2 с бензилвиологеном и 8,4 – 8,6 с бромфеноловым синим. Термостабильность изучали при температуре 50°С и 60°С. При 50°С в течении первых 10 – 15 минут наблюдался рост активности на 2 – 3%, после чего следовал линейный спад до 30% от начального уровня за 220 мин. При экспозиции фермента на 60°С в течении первых 15 мин активность снижалась на 50%, после чего следовал линейный спад до 17% за 75 мин.

Таким образом в ходе проведения данной работы на молекулярно-биологическом и на биохимическом уровнях доказана способность различных представителей рода *Thiothrix* к дыханию на нитратах при культивировании в анаэробных условиях.

Таблица 1.

Количество белка и суммарная активность нитратредуктаз при аэробном и анаэробном культивировании у различных представителей рода *Thiothrix*

Вид	Активность Nar (мМ NO_2^- в мин/мг белка)	
	аэробно	анаэробно
T. unzii	3,6	19,4
Thiotrix sp. штамм *AS*	10,2	36
T. eikelboomii	0,48	1
T. lacustris штамм *BL*	9,14	31,7
T. culdifoutis штамм *G1*	5,56	26,67

Trubitsin I.V.[1], Andreevskih J.G.[1], Barkalova E.V.[1], Antipov A.N.[2]

BIOCHEMICAL AND GENETIC ASPECTS OF DISSIMILATORY NITRATE REDUCTION IN GENUS *THIOTHRIX*

[1]Voronezh State University, Voronezh, Russia; tru.ivan@mail.ru;

[2]A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Moscow, Russia

Summary. For the first time it was shown that the organisms of genus *Thiothrix* are capable of dissimilatory nitrate reduction (*Thiothrix* sp.: strains AS, *T. unzii, T. eikelboomii , T. culdifoutis* strain G1 and *T. lacustris* strain BL). It was established, that there was a relationship between nitrate reduction and thiosulfate oxidation.

In addition, the presence of narG gene in strain AS was demonstrated. This gene encodes the α-subunit protein of respiratory nitrate reductase. The expression of narG gene was studied under aerobic and anaerobic cultivation. Total activity of nitrate reductases was measured under similar conditions. The incomplete purification of membrane-bound enzyme NarGHI was carried out. A number of physicochemical properties of this enzyme were studied.

Key words: nitrate reductase, anaerobic and aerobic cultivation, dissimilatory nitrate reduction.

УДК 579.26

Тухбатова Р. И., Панкова А. В., Мельников Л. В., Алимова Ф. К.

МИКРОБИОТА ПАЛЕОПОЧВ БОЛЬШЕ-КЛЯРИНСКОГО ГОРОДИЩА ЭПОХИ СРЕДНЕВЕКОВЬЯ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, resedushka@bk.ru

Резюме. Проведены исследования палеопочв Больше-Кляринского городища (IX - XI вв. н. э.). Впервые в Поволжье были изучены микробные сообщества погребенных почв, определены биомасса микроорганизмов, дыхательная и азотфиксирующая активность, численность микроорганизмов различных трофических групп.

Ключевые слова: палеопочвы, палеомикробиология.

Введение

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов, которые принимают участие в процессах формирования и очищения почвы, а также круговорота веществ в природе. Жизнедеятельность микроорганизмов в почве, их качественный и количественный состав определяется почвенными условиями: наличием питательных веществ, влажностью, аэрацией, реакцией среды, температурой и т.д.

На сегодняшний день накоплено огромное количество данных о разнообразии микроорганизмов современных горизонтов почв, о влиянии на них экологических и физических факторов окружающей среды. Наряду с этим, работы по микробиологии палеопочв практически отсутствуют. Можно сослаться лишь на единичные данные, но и в этих работах только констатируется наличие живых микроорганизмов в палеопочвах и отмечается их существенно меньшая численность по сравнению с современными фоновыми почвами [1, 2, 3]. Работы же зарубежных исследователей, касающиеся проблемы микробиологического изучения погребенных почв грунтовых памятников древней и средневековой истории, скорее всего крайне ограничены, либо вовсе отсутствуют.

Материалы и методы исследования

Нами были исследованы современные и погребенные почвы в районе расположения Больше-Кляринского городища (Камско-Устьинский район, Республика Татарстан). Создание Больше-Кляринского городища относится к булгарскому раннему периоду (VIII-X вв. н.э.). Почвенный покров при формировании древнего городища имел уклон, вследствие чего одна часть вала располагалась выше, а другая ниже уровня моря с различными условиями увлажненности атмосферными осадками. Тип почвы в исследуемом районе отнесен к среднемощному среднегумусному тяжелосуглинистому выщелоченному чернозему. Погребенная почва под периферийным валом представляет собой гумусовый слой, трансформировавшийся в гидроморфных (Гп) и автоморфных (Ап) условиях, вследствие чего сформировались различные условия консервации гумусового горизонта. Почвенный покров над погребенной почвой представлен периферийным валом и представляет собой новообразованный гумусовый слой, также трансформировавший-

ся в гидроморфных (Гн) и автоморфных (Ан) условиях. Кроме того, на срезе вала был обнаружен «коричневый слой» почвы, неизвестного происхождения.

Нами были исследованы такие показатели как численность и микробная биомасса, количественная и функциональная структура сообщества микроорганизмов, респираторная активность и интенсивность азотфиксации.

Результаты исследования и обсуждение

Анализ современных горизонтов фоновой почвы показал, что выщелоченные черноземы Камско-Устьинского района характеризуются высоким уровнем интенсивности дыхания, азотфиксации, биомассы и численности отдельных групп микроорганизмов: гетеротрофов, бактерий, потребляющих минеральные формы азота, и олиготрофов.

Сравнительный анализ современной фоновой, новообразованной на поверхности вала и погребенной почв городища, трансформировавшихся в гидроморфных условиях водного режима, показал, что в погребенной почве возрастает численность спорообразующих бактерий, сульфатредуцирующих бактерий и бактерий рода *Azotobacter и Clostridium* на фоне увеличения респираторной активности и процессов минерализации органического вещества.

В погребенном слое количество микроорганизмов – активных гумусообразователей – ниже (на 20%), чем в новообразованном. В новообразованной почве отмечено возрастание гетеротрофных, потребляющих минеральные формы азота и денитрифицирующих микроорганизмов и увеличение метаболического коэффициента по сравнению с погребенной почвой. Можно отметить возрастание жизнеспособности и активности в новообразованной почве и снижение активности в палеопочве автохтонной микрофлоры, участвующей в процессе гумусоразложения. По данным численности микроорганизмов «коричневый слой» характеризуется наименьшей напряженностью процессов, за исключением молочно-кислых бактерий – деструкторов, кислотообразователей. По данным коэффициентов педотрофности, олиготрофности в коричневом слое отмечена и слабая функциональная активность. Выявлена также тенденция к снижению интенсивности азотфиксации и дыхания в коричневом слое по сравнению с современной и погребенной почвами. Этой слой можно рассматривать как промежуточный от стадии разрушения и образования минералов к накоплению органического вещества с последующим формированием гумусового слоя.

Сравнительный анализ погребенной и новообразованной на валу почвы, трансформировавшейся в автоморфных условиях водного режима, показал, что в условиях консервации в погребенной почве сохранилось более высокое содержание гумуса – 6,4-6,7% против 5,6%. В автоморфном новообразованном слое отмечено увеличение численности автохтонной и олиготрофной микрофлоры, бактерий, потребляющих минеральные формы азота, участвующих в процессах разложения гумуса, гетеротрофов на фоне возрастания метаболического коэффициента. При их высокой активности в почве создается низкий поток доступных питательных веществ, что является стимулирующим фактором для олиготрофов, способных развиваться только в таких условиях.

Показателем активности почвенных гетеротрофных микроорганизмов является дыхание, а азотфиксирующих бактерий - интенсивность азотфиксации. В погребенной почве нами отмечено возрастание потенциальной активности газообмена и численности бактерий рода *Azotobacter*. Аналогичная картина описана для светло-каштановой почвы Ипатовского кургана-могильника степного Предкавказья [4].

Заключение

Таким образом, описана общая биологическая активность почв в районе расположения археологического памятника – Больше-Кляринского городища.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Савостьянова З.А., Нащокин В.Д.* К истории почвенного покрова степной зоны Хакасии // Почвенные условия выращивания защитных насаждений. – Красноярск, 1974. – С. 7–35.
2. *Золотун В.П.* Развитие почв юга Украины за последние 50-45 веков: автореф. дис. … докт. с.-х. наук. – Киев, 1974. – 44 с.
3. *Крупенников И.А.* Почвенный покров Молдовы: прошлое, настоящее, управление, прогноз. – Кишинёв: Штиница, 1992. – 265 с.
4. *Цховребов В.С., Каргалев И.В.* Эволюция почв в историческом цикле на примере Ипатовского кургана могильника // Циклы. Материалы второй Международной конференции. – Ставрополь, 2000. – С. 69–75.

Tukhbatova R.I., Pankova A.V., Melnikov L.V., Alimova F.K.

MICROBIOTA OF PALEOSOILS OF THE MIDDLE VOLGA REGION IN THE MIDDLE AGES

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia,

resedushka@bk.ru

Summary. Paleosoils of the Bolshe-Klyarinsk settlement (IX-XI centuries N.E.) were investigated. First time in Volga region were investigated microbial communities of buried soils, determined biomass of microorganisms, respiratory and nitrogen-fixing activity, the number of different trophic groups of microorganisms.

Key words: paleosoils, paleomicrobiology.

УДК 579.26

Уманская М.В., Краснова Е.С.

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ОЗЕРА КАНДРЫ-КУЛЬ В ЛЕТНИЙ ПЕРИОД 2010 г.

Учреждение Российской академии наук Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти, Россия, krasnova-eck@mail.ru

Резюме. В работе дана общая характеристика бактериопланктона оз. Кандры-Куль летом 2010 г. Общая численность бактерий изменялась от 0,39 до 3,83 млн кл/мл, в среднем составила 1,26 млн. кл/мл. В озере были выявлены значительные пространственные и временные колебания исследованных микробиологических показателей. Корреляционный анализ показал, что с увеличением концентрации $P_{мин}$ и УЭП снижается средний объем бактериальных клеток и увеличивается степень агрегированности бактериопланктона.

Ключевые слова: озера, бактериопланктон, пространственное распределение, факторы среды.

Введение

Озеро Кандры-Куль расположено в центре Бугульминско-Белебеевской возвышенности и является вторым по площади пресным водоемом Башкортостана. Однако до настоящего времени бактериопланктон, являющийся важным компонентом планктонного сообщества озера, не был изучен. Цель данной работы – дать общую характеристику бактериопланктона озера Кандры-Куль и проанализировать факторы среды, влияющие на его развитие.

Материалы и методы исследования

Отбор проб воды для микробиологического анализа проводили 26.06. и 02.09.2010 г. батометром Руттнера в стерильные стеклянные склянки. Всего было отобрано 32 пробы на 2 пелагических и 8 литоральных станциях. Общая характеристика химического состава и трофического состояния озера в 2010 г. дана в работе [1]. Учет общей численности и биомассы бактерий проводили эпифлуоресцентным методом [2]. Для учета численности культивируемых гетеротрофных бактерий использовали среду R2A [3], а сапрофитных – РПА [4]. Для анализа полученного массива данных использовался стандартный пакет STATISTICA 6.0.

Исследованные показатели бактериопланктона (БП) сильно варьировали в период наблюдений (таблица). В среднем, общая численность бактерий в пелагиали была несколько ниже, чем в литорали, но разброс значений на разных литоральных станциях был более выражен, чем на разных горизонтах пелагических станций. Вертикальное распределение БП было изучено только в пелагиали (ст.1). Были обнаружены сложные вертикальные изменения как общей численности бактерий (рисунок), так и численности отдельных групп (не показано). Возможно, сезонные изменения связаны с различными погодными условиями – в июне отбору предшествовала ясная, безветренная погода, а в сентябре – штормовая, с сильными волнением на озере.

В литорали нам не удалось отобрать пробы в июне и сентябре в одних и тех же точках из-за сезонных изменений в развитии макрофи-

Таблица.

Общая характеристика бактериопланктона оз. Кандры-Куль.

Тип биотопа	n	N, 106 кл/мл	B, мг/м3	РПА, 103 КОЕ/мл	R2A, 103 КОЕ/мл
26 июня					
Пелагиаль	12	0,76±0,14	69±18	4,00±2,84	15,69±12,71
Литораль	7	1,99±0,99	172±125	9,21±17,04	31,65±36,39
Все озеро	19	1,21±0,45	107±51	5,63±5,45	20,68±14,09
2 сентября					
Пелагиаль	8	1,28±0,18	67±8	1,85±2,58	6,48±7,33
Литораль	5	1,45±0,27	54±15	1,53±1,66	9,92±5,65
Все озеро	13	1,34±0,15	62±8	1,73±1,66	7,80±4,93
В целом					
Пелагиаль	20	0,97±0,17	68±11	3,10± 2,04	11,81±8,07
Литораль	12	1,76±0,59	123±79	5,37±8,45	20,79±18,76
Все озеро	32	1,26±0,27	89±31	3,88±3,11	14,90±8,30

Примечание: n – число проб, N – общая численность, B – общая биомасса. Показаны средние значения ± доверительные интервалы при уровне значимости 95%.

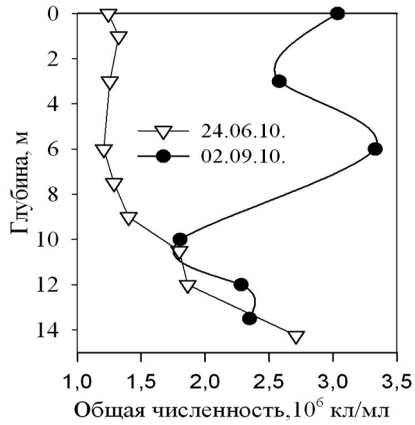


Рисунок. Вертикальное распределение бактерий в оз. Кандры-Куль летом 2010 г.

тов, за исключением зарослей *Hippurus vulgaris L.* и *Chara* sp. Поэтому сравнение сезонных изменений БП в разных типах зарослей провести невозможно. Но, тем не менее, среднее значение численности обеих групп бактерий в июне месяце была выше, чем в сентябре (таблица). В июне максимальное развитие культивируемых бактерий наблюдалось в зарослях *Chara* sp., а в сентябре – в зарослях *Potamogeton* sp. (узколистный). При этом максимальная общая численность бактерий в оба месяца была зарегистрирована в зарослях *Hippurus vulgaris L.*

Был проведен анализ сходства всех отобранных проб БП по размерной и морфологической структуре, степени агрегированности, общей численности и биомассе. Было выявлено 2 крупных кластера проб с высокой степенью сходства. Большая часть проб, входящих в каждый кластер, относится к одной дате, независимо от расположения станции, ее глубины, наличия и вида растительности на ней.

Проведенный нами корреляционный анализ показал следующее: 1) численность и биомасса БП достоверно не коррелируют с концентрацией биогенных элементов и физико-химическими факторами; 2) средний объем клеток достоверно уменьшается с увеличением концентрации Рмин и УЭП (r = -0,54 и -0,43); 3) степень агрегированности БП достоверно возрастает с увеличением концентрации биогенных элементов (P, N-NH_4, Si, Fe) и УЭП (r= +0,73; +0,75; +0,65; +0,68 и +0,54, при p=0,05, соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Жариков В.В., Горбунов М.Ю., Уманская М.В., Тарасова Н.Г., Быкова С.В., Мухортова О.В., Краснова Е.С.* Современное состояние планктонного сообщества и трофический статус оз. Кандры-Куль (Башкортостан, Россия) // Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды: Тез. докл. IV Междунар. Науч. конф., 12-17.09.2011, Минск-Нарочь. – Минск: Изд.центр БГУ, 2011. – С. 19.

2. *Porter K.G., Feig Y.S.* The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. – 1988. – V. 25. N. 5. – P. 943–948.

3. *Reasoner D.J., Geldreich E.E.* A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water // Aquat. Environ. Microbiol. – 1985. – V. 49. N. 1. – P. 1–7.

4. *Кузнецов С.И., Дубинина Г.А.* Методы изучения водных микроорганизмов. – М.: Наука, 1989. – 288 с.

Umanskaya M.V., Krasnova E.C.

CHARACTERISTIC OF BACTERIOPLANKTON OF LAKE KANDRY-KUL IN SUMMER 2010

Institute of Ecology of Volga Basin, Togliatti,

Russia, krasnova-eck@mail.ru

Summary. Characterization of bacterioplankton of Lake Kandry-Kul in summer 2010 is presented in this paper. The total abundance of bacteria varied from 0.39 to 3.83 million cells / ml (1.26 million cells / ml in average). Considerable spatial and temporal changes of the investigated microbiological parameters have been revealed in the lake. Correlation analysis has shown that with the increase of concentration Pmin and electroconductivity reduced the average volume of bacterial cells and increases the degree of aggregation of bacterioplankton.

Key words: lakes, bacterioplankton, spatial heterogeneity, ecological factors.

УДК 579.61

Уткина Т.М., Карташова О.Л.

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ В СИСТЕМЕ «СТРУКТУРА-ФУНКЦИЯ» НА ПРИМЕРЕ ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ

Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза

Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, ikvs@esoo.ru

Резюме. В эксперименте *in vitro* изучено влияние пентациклических тритерпеноидов на персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов. В результате проведенных исследований биологических свойств отдельных структурных фрагментов синтезированных химических соединений экспериментально обоснована роль коричной кислоты в повышении их ингибирующего действия на персистентные свойства микроорганизмов. Установлено, что введение в структуру пентациклических тритерпеноидов фрагментов коричной кислоты повышало их антиперсистентное действие. Полученные данные могут быть использованы для разработки и синтеза новых препаратов, пригодных для терапии хронических инфекций, ассоциированных с персистенцией в макроорганизме бактериальных патогенов.

Ключевые слова: пентациклические тритерпеноиды, микроорганизмы, персистентные свойства.

Введение

Феномен выживания бактерий в организме хозяина рассматривается как одно из важных звеньев в патогенезе инфекционного процесса. Выживание бактерий в макроорганизме реализуется через их адаптацию к факторам защиты хозяина и может быть связано с инактивацией последних. В настоящее время установлено, что микроорганизмы способны подавлять многие факторы естественной резистентности организма хозяина, такие как лизоцим, комплемент, лактоферрин и т.д. [1]. Поиск новых лекарственных средств с антиперсистентной активностью остается актуальным, несмотря на большое число используемых антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний, что связано с распространением в клиниках резистентных возбудителей [2]. Последние два десятилетия дали основания возлагать надежды на введение в терапию ряда болезней препаратов на основе тритерпеноидов лупанового ряда, в частности, среди тритерпеноидов наиболее широко распространенными в природе и легко получае-

мыми практически в любом количестве, является бетулин [3]. В связи с этим интерес представляет изучение связи между структурой химических соединений и их способностью подавлять персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали вновь синтезированные пентациклические тритерпеноиды, структурной основой которых являются бетулин и аллобетулин. Объектом для исследования служили штаммы, принадлежащие к *Citrobacter diversus, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae* № 278, *Staphylococcus aureus* и обладающие персистентными свойствами. Изучение влияния химических соединений на факторы персистенции микроорганизмов проводили на 20 клонах, полученных из штаммов исследуемых микроорганизмов. Для идентификации культур использовали стандартные тест-системы STAPHYtest, ENTEROtest, («LaChema», Чехия). Антилизоцимную и антикарнозиновую активность бактериальных штаммов определяли по [1].

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что наиболее эффективное ингибирующее действие на факторы персистенции стафилококков и клебсиелл оказывали соединения, содержащие в своей структуре фрагменты коричной кислоты [4]. Для доказательства роли коричной кислоты, как компонента, повышающего антиперсистентное действие соединений, была изучена биологическая активность каждого фрагмента, входящего в состав соединений, а также их комбинаций: коричная кислота + бетулин, коричная кислота + аллобетулин, коричная кислота + хинопимаровая кислота, имеющая с изученными соединениями структурные различия (использована в качестве контроля).

В результате проведенных исследований установлено, что бетулин, аллобетулин и хинопимаровая кислота оказывают разнонаправленное действие на факторы персистенции исследованных бактерий: повышающее, подавляющее и индифферентное. Присоединение к каждому из них коричной кислоты сопровождалось изменением характера влияния на персистентные характеристики исследуемых культур – наблюдалось однонаправленное ингибирующее действие.

Заключение

Изменение персистентных свойств бактериальных культур под воздействием пентациклических тритерпеноидов разнонаправлено и определяется химической структурой соединений и видовой принадлежностью бактерий; введение в структуру пентациклических тритерпеноидов фрагмента коричной кислоты усиливает антиперсистентное действие изученных химических соединений.

Работа поддержана грантом 10-4-ИП-430 «Инновационные проекты молодых ученых УрО РАН».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бухарин О.В.* Персистенция патогенных бактерий. – М.: Медицина, 1999. – 365 с.

2. *Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Усвяцов Б.Я.* Влияние лекарственных растений на антилизоцимную активность микроорганизмов // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48. №5. – С. 11 – 14.

3. *Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин* и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – №13. – С. 1–30.

4. *Уткина Т.М., Карташова О.Л., Казакова О.Б.* Модификация антилизоцимной активности микроорганизмов под влиянием пентациклических тритерпеноидов // Тез. докл. VIII Всерос. конф. с междунар. участием «Химия и медицина». – С. 328.

Utkina T.M., Kartashova O.L.

COMMUNICATION STUDYING IN SYSTEM «SRTUCTURE-FUNCTION» ON AN EXAMPLE TRITERPENOID DERIVATIVES OF THE LUPINE LINE

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis,
Orenburg, Russia, ikvs@esoo.ru

Summary. The influence of triterpenoid derivatives of the lupine line on the persistence properties of opportunistic microorganisms is studied in the experiment in vitro. The role of cinnamon acid in the increase of inhibiting action of separate fragments of the synthesized chemical compounds on the persistence properties of microorganisms is shown. It is established that the introduction of the lupine line fragments of cinnamon acid in triterpenoid derivatives structure raised their antipersistence properties. The obtained data can be used for working out and synthesis of new preparations, suitable for therapy of chronic infections associated with bacterial pathogens persistence in the macroorganism.

Key words: triterpenoid derivatives of the lupine line, microorganisms, persistence properties.

УДК 579.222

Ушаков В.Ю.

ИЗМЕНЕНИЕ Eh И УРОВНЯ ТИОЛОВ У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, ushakovvad@yandex.ru

Резюме. В данной работе показано, что обработка клеток ципрофлоксацином приводит к скачку Eh и изменению уровня экстраклеточных тиолов как у бактерий родительского типа, так и у мутантов по глутатиону.

Ключевые слова: *E. coli*, ципрофлоксацин, редокс-потенциал, экстраклеточные тиолы.

Введение

Ранее было показано, что в ответ на различные стрессы (температурный и осмотический шок, голодание, действие антибиотиков и т.д.) в аэробных культурах грамположительных и грамотрицательных бактерий наблюдаются скачки редокс-потенциала (Eh). Так, при добавлении в среду культивирования бактерий *E. coli* хлорамфеникола происходило падение Eh в область отрицательных значений. В дальнейшем было обнаружено, что наблюдаемые при стрессах изменения редокс-потенциала связаны с изменением концентрации низкомолекулярных тиолов снаружи клетки. Было показано также, что у бактерий *E. coli* основной вклад в тиолы, выходящие из клетки во время стрессового воздействия, вносит глутатион (GSH). Цель настоящей работы – измерение уровня внеклеточных тиолов и Eh в клетках *E. coli* родительского типа и мутантах по синтезу глутатиона при действии ципрофлоксацина.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали генно-инженерные штаммы BW25113 (wt) и JW 2663 (gsh^-). Клетки выращивали в аэрируемой среде М9 с глюкозой (1 г/л); в процессе культивирования производили непрерывную регистрацию Eh и парциального давления кислорода (pO_2).

Результаты и обсуждение

Добавление 0,3 мкг/мл ципрофлоксацина вызывало снижение скорости роста у обоих исследуемых штаммов на 45%. Высокая концентрация антибиотика (3 мкг/мл) вызывала полную остановку роста.

Изменение редокс-потенциала и уровня экстраклеточных тиолов зависело от исследуемого штамма и концентрации антибиотика. При добавлении 0,3 мкг/мл ципрофлоксацина происходило падение Eh и повышение концентрации тиолов в среде у обоих штаммов. Количество тиолов достоверно увеличивалось на 65% у клеток родительского типа и на 27% у бактерий, лишенных глутатиона (рис 1, 2). Обработка 3 мкг/мл ципрофлоксацина приводила к возрастанию уровня экстраклеточных тиолов у бактерий BW25113 на 65%. В мутантах gsh^- высокая доза антибиотика не вызывала изменения уровня тиолов снаружи клетки.

При добавлении антибиотика в среду культивирования парциальное давление кислорода увеличивалось на 25% у обоих штаммов по отношению к контролю, что, вероятно, связано с ингибированием дыхания.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что при действии ципрофлоксацина происходит выход тиолов из клетки как в

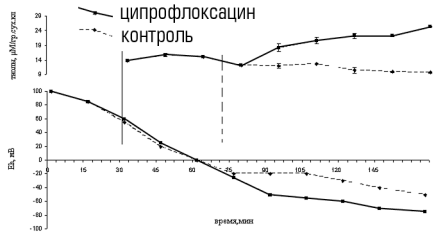


Рис.1. Изменение Eh и концентрации экстраклеточных тиолов у бактерий *E. coli* BW25113(wt) при добавлении 0,3 μг/ml ципрофлоксацина. Сплошной вертикальной линией показан момент добавления глюкозы, пунктирной линией – добавление антибиотика. -■-ципрофлоксацин; -♦- - контроль.

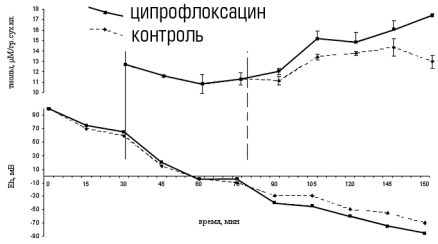


Рис.2. Изменение Eh и концентрации экстраклеточных тиолов у бактерий *E. coli* JW2663(gsh⁻) при добавлении 0,3 μг/ml ципрофлоксацина. Сплошной вертикальной линией показан момент добавления глюкозы, пунктирной линией – добавление антибиотика. -■- ципрофлоксацин; -♦- - контроль.

штамме родительского типа, так и мутантах по глутатиону.

Работа выполнена при поддержке гранта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Ushakov V.Yu.

SHIFT OF Eh VALUE AND THIOL LEVELS IN *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA EXPOSED TO CIPROFLOXACIN ACTION

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

Perm, Russia, ushakovvad@yandex.ru

Summary. The results of the present study indicate that cell treatment with ciprofloxacin leads to Eh shift and change in extracellular thiol levels both in a parent strain and a glutathione-deficient strain.

Key words: *Escherichia coli*, ciprofloxacin, redox potential, extracellular thiols.

УДК 579.243

Филатова Л.Б., Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Монахов В.И., Коробов В.П.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ДЕТЕРГЕНТОВ И КАТИОННОГО ПЕПТИДА ВАРНЕРИНА

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, poludova@iegm.ru

Резюме. В работе представлены данные анализа бактериолитического действия на клетки *S. epidermidis* 33 катионного пептида варнерина и различных детергентов – додецилсульфата натрия, цетавлона и тритона Х-100. Показано, что в использованных концентрациях (2 ККМ) наибольшим лизирующим действием обладает катионный детергент цетавлон. Антибактериальный эффект катионного пептида варнерина во многом совпадает с действием цетавлона, что свидетельствует о наличии у пептида детергентных свойств.

Ключевые слова: стафилококки, варнерин, аутолизины, детергенты.

Введение

Заболевания стафилококковой этиологии составляют значительную часть нозокомиальных инфекций, борьба с которыми осложнена быстрым появлением устойчивости возбудителей к широко используемым антибиотикам [1]. Это определяет необходимость поиска новых эффективных соединений, обладающих высокой антибактериальной активностью. В этой связи привлекают внимание низкомолекулярные катионные пептиды семейства лантибиотиков [2]. Воздействуя на связанные с пептидогликаном клеточной стенки аутолизины, катионные пептиды, по-видимому, вызывают активацию локализованных в клеточных стенках гидролитических ферментов [3], результатом которой является лизис и гибель атакуемых бактериальных клеток. Конкретные механизмы эффектов катионных пептидов изучены недостаточно. Целью работы явилось сравнение литических эффектов низкомолекулярного катионного пептида варнерина и детергентов, различающихся электрической природой заряда их молекул.

Материалы и методы исследования

В работе использовали коллекционный штамм *S.epidermidis* 33, полученный в ГНИИСКМБП имени Тарасевича. Активацию литических процессов инициировали внесением в суспензии бактерий *S.epidermidis* 33 в 10 мМ трис HCl (pH 7.2) катионного пептида варнерина и различных детергентов – анионного додецилсульфата натрия, катионного цетавлона и нейтрального тритона Х-100, в концентрациях, близких к критическим концентрациям мицеллообразования (2ККМ). Инкубацию бактерий проводили на шейкере при 150 об/мин и 37°С в течение 4 часов. Оценку динамики лизиса бактериальных клеток проводили измерением оптической плотности при OD_{600}. Параллельно в аликвотах клеточных суспензий проводили изучение количеств интактных клеток (КОЕ/мл), как описано ранее [3].

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что варнерин и детергенты обладают выраженным бактериолитическим действием. Эффекты детергентов в использованных концентрациях были несколько слабее действия пептида (Рис.1). Наиболее быстрым литическим действием на бактериальные клетки обладал цетавлон – уже через 30 мин инкубации происходило максимальное снижение оптической плотности клеточной суспензии. Литический эффект варнерина в значительной степени проявлялся на более поздних сроках, а к окончанию инкубации действие этих соединений, практически, было одинаковым и характеризовалось тотальным бактериолизисом. В то же время, присутствие в среде инкубации додецилсульфата натрия и тритона Х-100 вызывало лишь минимальное снижение оптической плотности суспензии бактерий.

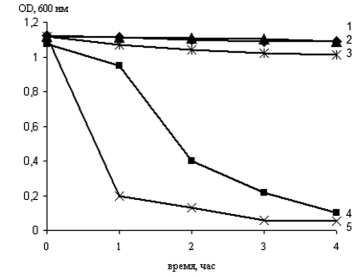


Рис. 1. Литическое действие низкомолекулярного пептида варнерина и различных детергентов на бактерии *S.epidermidis* 33. 1 – 10 мМ Трис HCl pH 7.2, 2 – тритон Х-100 (2ККМ), 3 – додецилсульфат натиря (2ККМ), 4 – варнерин,5 – цетавлон (2ККМ).

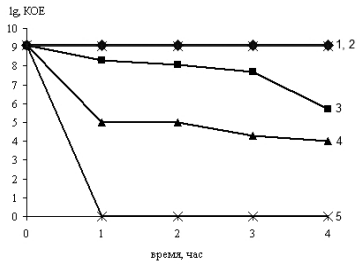


Рис. 2. Подавление жизнеспособности бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 варнерином и различными детергентами. 1 – 10 мМ Трис HCl pH 7.2, 2 – тритон Х-100 (2ККМ), 3 – варнерин (125 мкМ), 4 – додецилсульфат натрия (2ККМ), 5 – цетавлон (2ККМ).

Определение количества жизнеспособных клеток в бактериальных суспензиях показало (Рис. 2), что уже через час действия цетавлона живые клетки в них не обнаруживались. Через 4 ч действия варнерина число живых клеток снижалось на 5 порядков, а в присутствии додецилсульфата натрия – на 3 порядка. Необходимо отметить, что при действии тритона Х-100 количество живых клеток в суспензиях снижалось лишь незначительно.

Выводы

Таким образом, проведенным экспериментальным анализом установлено, что низкомолекулярный катионный пептид варнерин и использованные детергенты обладают бактериолитическим действием. Полученные данные позволяют также констатировать, что проявление антибактериальных свойств варнерина, возможно, связано с его детергентными свойствами.

Работа поддержана грантами РФФИ №№10-04-96086-р_урал_а, 11-04-96025-р_урал_а, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биологияЦ (проект № 09-П-4-1019) и УрО РАН (проекты №№09-М-14-2002, 10-14-12-НАБ).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C.Q.* Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides // J. Appl. Microbiol. – 2008. – V. 104. № 1. – P. 1–13.

2. *Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В.* Продукция антибактериального фактора широкого спектра действия клетками *Staphylococcus warneri* // Доклады академии наук. – 2003. – Т. 390. № 5. – С. 703–705.

3. *Коробов В.П., Полюдова Т.В., Филатова Л.Б., Лемкина Л.М., Панькова Н.В.* Активация аутолитической активности *Staphylococcus epidermidis* 33 низкомолекулярным катионным пептидом варнерином // Микробиология. – 2010. – Т. 79. № 1. – С. 133–135.

Filatova L.B., Poludova T.V., Lemkina L.M., Monachov V.I., Korobov V.P.

COMPARATIVE ASSAY OF BACTERIOLYTIC EFFECTS OF DETERGENT AND CATIONIC PEPTIDE WARNERIN

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

Perm, Russia, poludova@iegm.ru

Summary. There are presented the analytical data on bacteriolytic actions of cationic peptide warnerin and different detergents – sodium dodecyl sulfate, cetavlon and Triton X-100 on *S. epidermidis* 33 cells. It was demonstrated that while using the concentrations of 2 CCM highest lysing effect exhibited cationic detergent cetavlon. Antibacterial effect of cationic peptide warnerin coincided to a great extent to cetavlon action that evidenced for the presence of detergent properties in this peptide.

Key words: staphylococci, warnerin, autolysins, detergents.

УДК 579.2

Хузяхметова В.Р., Шарипова И.Р., Яруллина Д.Р., Фахруллин Р.Ф., Ильинская О.Н.

МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОК ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, Venus154@mail.ru

Резюме. Микроорганизмы рода *Lactobacillus* находят широкое применение в биотехнологии и пищевой промышленности. В настоящей работе показано, что модификация поверхности лактобацилл магнитными наночастицами не оказывает токсического эффекта на клетки, ведет к усилению их пробиотических свойств и может применяться для разделения микроорганизмов разных видов.

Ключевые слова: лактобациллы, магнитные наночастицы, модификация поверхности, жизнеспособность, адгезия.

Введение

Модификация клеток магнитными наноматериалами обладает громадным потенциалом применения в клеточной инженерии, микроэлектронике и создании электрохимических сенсоров, поскольку позволяет манипулировать отдельными клетками, направленно изменять их свойства, регулировать физиологическую активность и многое другое [1]. Микроорганизмы рода *Lactobacillus*, благодаря пробиотической активности и высокой выживаемости в желудочно-кишечном тракте, рассматривают как перспективное средство доставки терапевтических агентов *in situ* в организме [2]. Цель настоящей работы − модификация бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 магнитными наночастицами (МНЧ).

В результате проведенных исследований впервые проведена магнетизация клеток *L. plantarum* 8P-A3 в условиях, сохраняющих жизнеспособность бактерий, при этом экспериментально обосновано усиление пробиотических свойств у модифицированных лактобацилл и возможность использования данного подхода для разделения микроорганизмов разных видов.

Материалы и методы исследования

Магнитную функционализацию клеток *L. plantarum* 8P-A3 осуществляли с помощью стабилизированных полиаллиламин гидрохлоридом магнитных наночастиц (рис. 1б) [1, 3]. Распределение наночастиц на поверхности лактобацилл регистрировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1а). Оценка жизнеспособности клеток по методу окрашивания флуоресцентными индикаторами LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kit (Invitrogen) показала, что соотношение живых и мертвых бактерий не отличается в образцах интактных и магнетизированных лактобацилл. Другим доказательством сохранения жизнеспособности у магнетизированных клеток явилась их способность расти и размножаться при высеве на питательную среду.

Результаты и обсуждение

По нашим данным, образование агрегатов магнетизированных бактерий зависело от плотности бактериальной суспензии. Так, при плотности 104 кл/мл их число увеличивалось в 2 раза, при 103 кл/мл – в 5 раз по сравнению с таковым при плотности культуры 105-107 кл/мл. Эффекты магнетизации в отношении пробиотических свойств лактобацилл оценивали по ее воздействию на адгезивную активность бактерий и гидрофобные свойства клеточной поверхности как факторы пробиотического потенциала штамма. С помощью световой микроскопии обнаружили, что у магнетизированных бактерий *L. plantarum* 8P-A3 адгезия на буккальных эпителиоцитах на 51% выше, чем у интактных клеток. Гидрофобность клеточной поверхности, измеренная по степени связывания бактерий *н*-гексадеканом [4], при этом возрастала на 5%. Магнитная модификация может применяться для разделения клеток, что было продемонстрировано в эксперименте по сепарации магнетизированных лактобацилл и интактных клеток *Saccharomyces cerevisiae*. С помощью магнита удалось на 94,5% разделить смесь на составляющие ее популяции клеток.

Выводы

Модификация бактерий *L. plantarum* 8P-A3 с помощью МНЧ не ока-

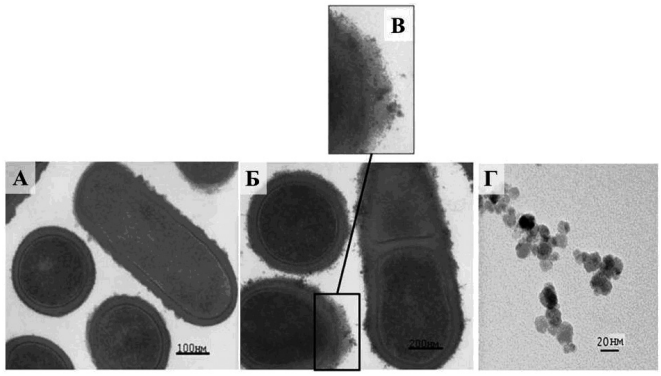


Рисунок. Просвечивающая электронная микроскопия поперечных срезов клеток *L. plantarum* 8P–A3. А – интактные клетки; Б – клетки, модифицированные магнитными наночастицами; В – модифицированная поверхность клеток бактерий; Г – магнитные наночастицы.

зывает токсического действия на лактобациллы, приводит к увеличению их адгезивной активности, а также позволяет эффективно разделять клетки в смеси. Данный подход открывает перспективы практического манипулирования клетками лактобацилл с целью усиления их пробиотического потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fakhrullin R.F., Garcia-Alonso J., Paunov V.N.* A Direct technique for preparation of magnetically functionalised living yeast cells // Soft Matter. – 2010. – V. 6. – P. 391–397.

2. *Kleerebezem M., de Vries M.C., Vaughan E.E., de Vos W.M. Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract // Int. Dairy Journal. - 2006. – V. 16. – P. 1018–1028.

3. *Zhang D., Fakhrullin R.F., Özmen M., Wang H., Wang J., Paunov V.N., Li G., Huang W.E.* Functionalisation of whole cell bacterial reporters with magnetic nanoparticles // Microb. Biotech. – 2011. – V. 4. – P. 89–97.

4. *Klayraung S., Viernstein H., Sirithunyalug J., Okonogi S.* Probiotic properties of lactobacilli isolated from thai traditional food // Sci Pharm. – 2008. – V. 76. – P. 485–503.

Khuzyakhmetova V.R., Sharipova I.R., Yarullina D.R., Fakhrullin R.F., Ilinskaya O.N.

FUNCTIONAL MODIFICATION OF PROBIOTIC LACTOBACILLI CELLS USING MAGNETIC NANOPARTICLES

Kazan (Volga Region) Federal University,
Kazan, Russia, Venus154@mail.ru

Summary. Lactobacilli are widely used in biotechnology and food industry. A promising approach of biotechnology is to modify bacterial cells using nanomaterials. We evaluated the effect of modification with magnetic nanoparticles on *L. plantarum* 8P-A3 and showed that this modification is not toxic for lactobacilli and leads to an increase in their adhesive activity. This approach offers the prospect of practical manipulation of lactobacilli cells to enhance their probiotic potential.

Key words: lactobacilli, magnet nanoparticles, surface modification, viability, adhesion.

УДК: 577.212.3

Цветкова Н.А., Гузачева И.М.

СЦЕПЛЕНИЕ CHI – САЙТОВ И G4 ДНК СТРУКТУР В ГЕНОМАХ *ESCHERICHIA COLI* И *PSEUDOMONAS*

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, tsvetkovanatalya@mail.ru

Резюме. В бактериальных геномах найдены сцепленные последовательности Chi-сайта с возможными G4 ДНК мотивами. Чаще всего такие последовательности находятся в генах системы транспорта и метаболизма.

Ключевые слова: квадруплексы ДНК, Chi-сайт, рекомбинация.

Хорошо известен факт нахождения в геномах различных живых организмов, в том числе и человека, так называемых G4–структур, G4 ДНК мотивов или G-квадруплексов, которые формируют в молекуле ДНК так называемые «хрупкие сайты». Известно, что функцией семейства RecQ хеликаз может быть разрешение квадруплексных структур, что случается в течение репликации и транскрипции. Отсутствие данных хеликаз приводит к нарушению процессов репликации, рекомбинации и транскрипции [1]. У ряда бактерий, в том числе у *Escherichia coli* и *Pseudomonas* квадруплексные структуры были обнаружены в промоторных районах некоторых генов, в том числе и регуляторных [2]. Известно, что у *E. coli* RecQ хеликаза необходима для RecF – зависимой рекомбинации. Кроме того, у *E. coli* существует еще один основной рекомбинационный путь – RecBCD. RecBCD хеликаза/нуклеаза участвует в рекомбинационной репарации двунитевых разрывов ДНК и узнает специфическую последовательность в ДНК - Chi-сайт (crossover hotspot instigator 5′-GCTGGTGG-3′). Узнавание этого сайта приводит к сближению гомологичных участков ДНК через образование RecA филамента [3]. Цель настоящей работы – обнаружение в полных геномах бактерий *E. coli* и *Pseudomonas*, находящихся в базе данных NCBI, сцепленных вместе Chi-сайтов и 4G, определить функциональную принадлежность белков, кодируемых генами, в нуклеотидной последовательности которых были найдены данные участки. Провести анализ полученных результатов.

Поиск нуклеотидных последовательностей GCTGGTGGGG и GGGGCTGGTGG проводили с помощью BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) в случайным образом выбранных сиквенсах полных геномов *E. coli* и *Pseudomonas*. Для распределения по группам в соответствии с функциональной принадлежностью белков, в генах которых были обнаружены эти последовательности, был осуществлен поиск COG для каждого белка. Результаты поиска последовательностей в случайно выбранных геномах бактерий представлены в таблице.

Из таблицы видно, что сцепленные последовательности Chi и G4 находятся в геномах в определенных, приблизительно одинаковых количествах. Они предпочтительно расположены внутри генов. Их количество не зависит от длины генома.

При распределении генов, в которых были обнаружены искомые последовательности, по группам, в соответствии с классификацией COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins (http:www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/palox.cgi?fun=all)) было замечено, что большинство из них – гены белков, участвующих в процессах метаболизма и транспорта веществ, что представлено на рисунке. Эти результаты согласуются с результатами исследования квадруплексов у *E. coli*, где было обнаружено, что большинство G4 ДНК структур находятся в генах белков метаболизма и транспорта [2]. В классификации COG к категории «хранение информации и обработка» относятся белки, участвующие в транскрипции, трансляции, репликации, регуляции клеточного цикла. К категории «клеточные процессы» относятся белки, участвующие в строении клеточной стенки, посттрансляционной модификации белков, движении клетки, сигнала трансдукции.

Из рисунка видно, что последовательность GGGGCTGGTGG чаще встречается в генах регуляторных белков, чем GCTGGTGGGG, как у *E. coli*, так и у *Pseudomonas*.

Таким образом, квадруплексные структуры в ДНК могут быть сцеплены с Chi – сайтом. В геномах *Escherichia coli* и *Pseudomonas* объединённые последовательности находятся в определенном количестве и располагаются в генах в зависимости от функций белков, кодируемых ими.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arthanari H., Bolton P.H.* Functional and dysfunctional roles of quadruplex DNA in cells // Chem. Biol. – 2001. – V. 8. – P. 221–230.

2. *Rawal P., Kummarasetti V.B.R., Ravindran J., Kumar N., Halder K.* Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in Escherichia coli global regulation // Genome Res. –2006. – V. 16, (5). – P. 644–655.

3. *Spies M., Amitani I., Baskin R.J., Kowalczykow S.C.* RecBCD enzyme switches lead motor subunits in response to χ-recognition // Cell. – 2007. – V. 131 (4). – P. 694–705.

Таблица.

Количество последовательностей GCTGGTGGGG и GGGGCTGGTGG в геномах бактерий *E. coli* и *Pseudomonas*

Штамм № NCBI	Длина генома, п.о.	Общее количество последовательностей на геном		Количество последовательностей на положительной нити		Количество последовательностей на отрицательной нити		Количество последовательностей в межгенном пространстве	
		*	**	*	**	*	**	*	**
CP000094.2 *Pseudomonas*	6438405	31	22	17	11	14	11	2	–
FM209186.1 *Pseudomonas*	6601757	42	27	21	15	21	12	1	2
CP000949.1 *Pseudomonas*	5774330	51	29	25	11	26	18	1	–
CP000304.1 *Pseudomonas*	4567418	29	28	9	12	20	16	3	1
CP001846.1 *E. coli*	5386352	25	18	12	9	13	9	–	–
FN554766.1 *E. coli*	5241977	26	19	15	8	11	11	–	–
AP010953.1 *E. coli*	5697240	31	23	13	10	18	13	–	–
CP001665.1 *E. coli*	4570938	28	18	11	10	17	8	–	–

Примечание. * - GCTGGTGGGG; ** - GGGGCTGGTGG

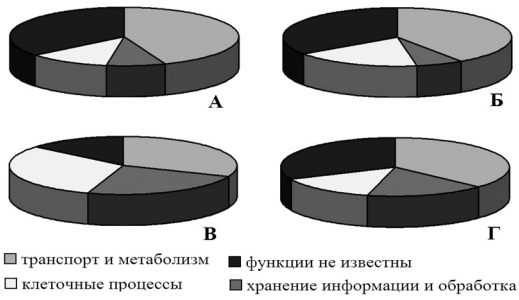


Рисунок. Распределение последовательностей GCTGGTGGGG (А, Б) и GGGGCTGGTGG (В, Г) по функциональной принадлежности белков генов *E. coli* (А, В) и *Pseudomonas* (Б, Г).

Tsvetkova N.A., Guzachova I.M.

CHAINED CHI – SITES AND G4 DNA STRUCTURES IN THE GENOMES *ESCHERICHIA COLI* AND *PSEUDOMONAS*.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

Perm, Russia, tsvetkovanatalya@mail.ru

Summary. Chained sequence Chi-site with probable G4 DNA motifs found in bacterial genomes. Most often, these sequences are located in the genes of transport and metabolism.

Kew words: quadruplex DNA, Chi-site, recombination.

УДК 575.223:582.282.23

Черненков А.Ю., Фёдоров Д.В., Ковальцова С.В., Евстюхина Т.А., Грачёва Л.М., Фёдорова И.В., Пешехонов В.Т., Королёв В.Г.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНА *HSM3* С ГЕНАМИ ЭПИСТАТИЧЕСКИХ ГРУПП РЕКОМБИНАЦИОННОЙ И ПОСТРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА HSM3 ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова», г. Гатчина, Россия, ancher@omrb.pnpi.spb.ru

Резюме. Ген *HSM3* участвует в контроле адаптивного мутагенеза. Мутаторный фенотип мутанта *hsm3* определяется процессами, протекающими в D-петле. Белок Hsm3 участвует в сборке протеасомного комплекса S26. Белок Hsm3 имеет, по крайней мере, два домена: N-терминальная часть ответственна за сборку протеасомы, а C-терминальный участок белка ответственен за мутагенез.

Ключевые слова: репарация, мутагенез, хроматин, D-петля.

В лаборатории генетики эукариот ПИЯФ РАН была получена коллекция мутантов *hsm* (от *англ*. high spontaneous mutagenesis) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Мутанты были выделены по повышенной частоте спонтанного мутагенеза канаванин-устойчивости, но при этом не изменяли чувствительности к летальному действию широкого спектра известных мутагенов, в том числе и к ультрафиолету (УФ). Наибольший интерес представлял мутант *hsm3*. С ним и была проведена последующая работа. Ген *HSM3* был картирован на правом плече II хромосомы на расстоянии 25cM от гена *HIS7*, была показана его 80% гомология с геном *MSH2* основной системы коррекции ошибочно спаренных оснований (КОСО, мисматч-репарация), установлено, что ген *HSM3* контролирует минорный путь системы КОСО, также мутант *hsm3* дефектен по коррекции гетеродуплексов ДНК [2, 3].

Было решено проверить взаимодействие мутации *hsm3* с мутациями по генам эпистатических групп пострепликативной (*RAD6*) и рекомбинационной репарации (*RAD52*). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ген *HSM3* контролирует одну из ветвей пострепликативной репарации [4] и принимает участие в устранении двуцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК в ходе рекомбинационной репарации [5]. В ходе работы дополнительно было установлено, что главным геном эпистатической группы *RAD52* является ген *XRS2*, а не *RAD52*, как считалось ранее [5, 6].

Нами также установлено, что мутация *hsm3* в сравнении с известными «классическими» мутагенами (метилметансульфонат, гамма-лучи, УФ, цис-платина) повышает частоты митотического кроссинговера и митотической сегрегации [6], что позволяет использовать данный мутант как биологический тестер для оценки вредного воздействия биологических и химический препаратов.

В 2004 году нами было выдвинуто предположение, что продукт гена *HSM3* имеет мультидоменную структуру, и C-концевой домен ответственен за мутагенез, N-концевой домен отвечает за опознавание повреждений в ходе репарации ДНК, а центральная часть отвечает за связывание с другими репарационными белками [6, 7]. В опытах по учету частот спонтанного и индуцированного мутагенеза нами было получено подтверждение данному предположению. В то же время в других лабораториях были получены данные, свидетельствующие о том, что белок Hsm3 играет роль в процессах репарации и репликации на уровне хроматина, участвует в сборке репарасомы [8], связан с пулом дезоксинуклеотидов [9], и было показано его прямое физическое взаимодействие с гистонацелиттрансферазой, кодируемой геном *HAT1* [10].

Нами было проведено исследование, в результате которого было установлено, что белок Hsm3 привлекается как модификатор структуры хроматина, за счет воздействия на белок Hat1 посредством изменения его конформации [неопубликованные данные], также показано, что Hsm3 вместо Hat1 берет на себя ключевую роль в пострепликационном синтезе и в репарации ДЦР ДНК [неопубликованные данные]. Полученные нами данные также свидетельствуют, что ген *HSM3* рабо-

тает на *RAD51*-зависимом пути рекомбинационной репарации структуры ДНК в хроматине [5].

Нами замечено, что при взаимодействии мутаций в гене *HSM3* с генами группы рекомбинационной репарации возникает эффект накопления мутаций или неустранения повреждений, оказывающихся гибельными для клетки. Это объясняется участием белка Hsm3 в сборке протеасомы [8] и формировании D-петель [5], которые не образуются, а, следовательно, не проходит и репарация, особенно на фоне мутации *rad52*, которая блокирует всю систему рекомбинационной репарации. Для мутанта *rad52* также показано, что клетки данного штамма имеют меньшую выживаемость за счет образования длиннопротяжных неустранимых брешей в структуре ДНК [неопубликованные данные].

В ходе работы были использованы следующие методы: ПЦР с короткими и длинными праймерами; real-time ПЦР; сверхэкспрессия белка на комбинированных средах; выделение больших количеств двуцепочечной бактериальной ДНК методом щелочного лизиса; выделение одноцепочечной ДНК с помощью фага-помощника; выделение хромосомной дрожжевой ДНК; рестрикция; очистка и переосаждение ДНК этанолом и хлороформом; ленинградский тест (упорядоченный посев) и метод медиан (метод Коулсона-Ли) для учета спонтанных мутаций канаванин-устойчивости; учет частоты мутаций, индуцированных УФ, по пяти *ADE*-локусам; обработка и последующий учет мутаций, индуцированных метилметансульфонатом, фторороткиовой кислотой и перекисью водорода; индукция однонитевых и двунитевых сшивок ДНК препаратом цис-платины; физическое и генетическое картирование; создание искусственных гетеродуплексов ДНК и учет эффективности их репарации; учет пула дезоксинуклеотидов; конструирование плазмид с заданными характеристиками и последующее разрушение генов в штаммах с использованием данных плазмидных конструкций; дрожжевая Li-трансформация; получение штаммов методом прямого скрещивания с последующим отбором на селективных средах; холодовая и термическая обработка штаммов (создание искусственно неблагоприятных условий для культивирования); очистка белков на колонках; кристаллизация белков; «лазерные пальцы» для изучения конформационного взаимодействия белков; компьютерный поиск гомологии и анализ нуклеотидных последовательностей (секвенирование); учет митотического кроссинговера и сегрегации (метод инверсии цвета).

ИТЕРАТУРА

1. *Федорова И.В., Ковальцова С.В., Иванов Е.Л.* Влияние мутаций hsm, повышающих спонтанную мутабельность, на индуцированный мутагенез и митотическую рекомбинацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. – 1992. – Т. 28. – С. 54–65.

2. *Fedorova I.V., Gracheva L.M., Kovaltsova S.V., Evstukhina T.E., Alekseev S.Y., Korolev V.G*. The yeast HSM3 gene acts in one of the mismatch repair pathways // Genetics. – 1998. – V. 148. N.3. – P. 963–973.

3. *Fedorova I.V., Kovaltzova S.V., Korolev V.G.* The yeast HSM3 gene is involved in DNA mismatch repair in slowly dividing cells // Genetics. – 2000. – V. 154. N.1. – P. 495–496.

4. *Черненков А.Ю., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А., Ковальцова С.В., Пешехонов В.Т., Федорова И.В., Королев В.Г.* Взаимодействие гена HSM3 с генами эпистатической группы RAD6 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. – 2011, в печати.

5. *Черненков А.Ю., Федоров Д.В., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А., Ковальцова С.В., Пешехонов В.Т., Федорова И.В., Королев В.Г*. Взаимодействие гена HSM3 с генами, инициирующими гомологичную рекомбинационную репарацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. – 2011, в печати.

6. *Ковальцова С.В., Черненков А.Ю., Королев В.Г.* Репарация цисплатиновых аддуктов ДНК в мутантах по генам, контролирующим спонтанный и индуцированный мутагенез у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. – 2007. – Т. 43. № 1. – С.100–104.

7. *Fedorova I.V., Kovaltzova S.V., Gracheva L.M., Korolev V.G.* Requirement of HSM3 gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Mutation Research. – 2004. – V. 554. – P. 65-75.

8. *Le Tallec B., Barrault M.B., Guerois R., Carre T., Peyroche A*. Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome // Mol. Cell. – 2009. – V. 33. N. 3. – P. 389–399.

9. *Roelofs J., Park S., Haas W., Tian G., McAllister F.E., Huo Y., Lee B.H., Zhang F., Shi Y., Gygi S.P., Finley D*. Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly // Nature. – 2009. – V. 459. N. 7248. – P. 861–865.

10. *Saeki Y., Toh-E A., Kudo T., Kawamura H., Tanaka K*. Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle // Mol. Cell. – 2009. – V. 137. N. 5. – P. 900–913.

Chernenkov A.Ju., Fedorov D.V., Kovaltsova S.V., Evstiukhina T.A., Gracheva L.M., Fedorova I.V., Peshekhonov V.T., Korolev V.G.

INTERACTIONS OF *HSM3* GENE WITH THE MEMBERS OF RECOMBINATION AND POSTREPLICATIVE DNA REPAIR EPISTATIC GROUPS AND YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HSM3 PROTEIN DOMAIN STRUCTURE GENETIC ANALISYS

B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia, ancher@omrb.pnpi.spb.ru

Summary. The yeast *Saccharomyces cerevisiae HSM3* gene takes part in post-replicative and recombination DNA repair. It is mapped on the right arm of chromosome II and is 80% homologous to the *MSH2* gene of the main mismatch repair system. *HSM3* gene controls the minor pathway of mismatch repair. The *hsm3* mutant is defective in DNA-heteroduplex repair and provides high spontaneous mutation rate under the influence of different mutation agents. The Hsm3 protein has a multi-domain structure and takes part in the D-loop formation, interacts with Hat1 (histone acetyltransferase complex) and plays the role in chromatin modifications and remodeling.

Key words: DNA repair, mutagenesis, chromatin, D-loop.

УДК 579.26

Чечёткина У.Е.[1], Евтеева Н.И.[2], Речкин А.И.[1]

ЭНТЕРОБАКТЕРИИ – ПРЕДСТАВИТЕЛИ МИКРОФЛОРЫ МЕДОНОСНЫХ ПЧЁЛ

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия, ulyana.85@mail.ru;

[2]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия», г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Представлены результаты исследования динамики пейзажа энтеробактерий у пчёл в различные сезоны года. Установлено постоянное присутствие представителей семейства *Enterobacteriaceae* в составе микрофлоры пчёл независимо от сезонов года. Причем в период активного медосбора в составе энтерофлоры наиболее часто обнаруживали бактерии рода *Enterobacter*, в зимний период доминировали представители рода *Klebsiella*.

Ключевые слова: энтеробактерии, медоносные пчёлы, микрофлора, встречаемость.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* известны как постоянные участники микробоценозов пищеварительной системы человека и животных. Вместе с тем, недостаточно изучена микрофлора энтеробактерий пищеварительной системы у беспозвоночных (насекомых, в частности). Особенности климата и фенологические явления растительного мира обусловливают периодичность жизнедеятельности пчелиных семей, в годовом цикле которых выделяются два этапа: (1) летний медосбор – активная жизнь вне улья у основной массы насекомых и контакты с разной микрофлорой; (2) зимовка – обитание в замкнутом пространстве и контакты только с микрофлорой пищи и семьи. В настоящее время практически отсутствует информация о том, каким образом формируется и изменяется состав энтерофлоры пчёл в зависимости от сезонов года. Цель настоящей работы – исследование динамики пейзажа энтеробактерий в составе микробоценоза кишечника пчёл в течение года.

В результате проведенного исследования выделены представите-

ли 10 родов бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae* – *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Pantoea, Proteus, Providencia, Serratia*. Обращает на себя внимание различие в составе энтерофлоры пчёл зимой и летом. Так, в зимний период спектр энтеробактерий включал представителей 6 родов (*Citrobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Proteus, Providencia*), а в период активного медосбора – 5 родов семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter, Klebsiella, Morganella, Pantoea, Serratia*).

В 90% проб, отобранных в период зимовки, обнаруживали бактерии *Klebsiella oxytoca*. Постоянное обнаружение *Klebsiella oxytoca* у зимующих пчёл позволяет предположить их физиологическую роль в переваривании корма насекомыми в этот период года. Значительно реже наряду с представителями *Klebsiella oxytoca* у обследованных пчёл обнаруживались представители родов *Citrobacter, Hafnia, Proteus, Providencia*. Проведенные исследования подтвердили постоянное присутствие энтеробактерий у пчёл в течение всего периода зимовки, что отмечалось и другими авторами [1].

После весеннего облёта состав энтерофлоры полностью изменился. Это может быть связано с обновлением пчелиной семьи. Доминирующие зимой представители *Klebsiella oxytoca* уже не обнаруживались, зато появлялись *Enterobacter* spp., причем частота встречаемости последних в составе энтерофлоры пчел к середине лета достигало 100%.

В отдельных пробах были изолированы культуры, принадлежащие к *Morganella* spp., *Serratia* spp. и *Pantoea* spp., что косвенно может свидетельствовать о возможной контаминации пчел в период посещения медоносных растений [2, 3, 4].

Возможно, такое массивное обнаружение энтеробактеров (90%) связано с их функциями в кишечнике пчёл, а именно, с их высокой ферментативной активностью [5]. Бактерии рода *Enterobacter* способны утилизировать глюкозу и сахарозу, составляющие основной рацион пчёл.

Весной и в начале лета бактерии рода *Klebsiella* не были обнаружены, однако, уже к середине лета (июль) они снова присутствовали в каждой пробе, что может свидетельствовать об их симбиотической роли в организме пчёл. Клебсиеллы выделялись в течение всего года, однако, после весеннего облёта они не обнаруживались, что, возможно, объясняется низкой обсемененностью медоносных растений данными микроорганизмами.

Проведенные исследования показали, что содержание энтеробактерий в составе микрофлоры пчел подвержено значительным изменениям в зависимости от времени года. Установлено постоянное присутствие представителей семейства *Enterobacteriaceae* в составе микрофлоры пчёл независимо от сезонов года. Наиболее часто в зимний период в составе энтерофлоры обнаруживались бактерии рода *Klebsiella*, а в период активного медосбора доминировали микроорганизмы рода *Enterobacter*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ляпунов Я.Э., Кузяев Р.З., Хисматуллин Р.Г., Безгодова О.А.* Энтеробактерии кишечника зимующих пчёл *Apis mellifera mellifera L.* // Микробиология. - 2008. - Т. 77. № 3. - С. 421-428.

2. *Маркова Ю.А., Романенко А.С., Духанина А.В.* Выделение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из растительных тканей // Микробиология. - 2005. - Т. 74. № 5. - С. 663-666.

3. *Евтеева Н.И., Речкин А.И., Крылов В.Н.* Энтерофлора медоносных пчёл // Пчеловодство. - 2009. - № 8 - С. 6-7.

4. *Евтеева Н.И., Речкин А.И.* Поиск новых резервуаров для персистенции и участников циркуляции энтеробактерий в естественных экосистемах // Вестник Нижегородского университета имени Н.И. Лобачевского. - 2007. - № 6. - С. 99-103.

5. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Пер. с анг. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса.. - М.: Мир, 1997. - 432 с. (Т. 1), 368 с. (Т. 2).

Chechetkina U.E.[1], Evteeva N.I.[2], Rechkin A.I.[1]

ENTEROBACTERIA - REPRESENTATIVES OF HONEYBEE MICROFLORA

[1]N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia, ulyana.85@mail.ru

[2]Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

Summary. This paper presents the results of investigations on enterobacterial diversity dynamics in honeybees in different seasons. The permanent presence of representatives of the family *Enterobacteriaceae* in honeybees has been established regardless of the season. And during the active honey flow periods, the most commonly found in enteroflora were the bacteria of the genus *Enterobacter*. Microorganisms of the genus *Klebsiella* dominated in the winter season.

Key words: enterobacteria, honeybees, microflora, occurrence.

УДК 574.24

Широкова О.А.[1,2], Нестерова Л.Ю.[2], Ткаченко А.Г.[1,2]

БИОГЕННЫЕ ПОЛИАМИНЫ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *ESCHERICHIA COLI*

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, olga.shirockova@gmail.com, agtkachenko@iegm.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, Россия, larisa.nesterova@bk.ru

Резюме. Установлено, что биогенные катионы полиамины оказывают влияние на способность *E. coli* к формированию биоплёнок. Внесение в среду культивирования путресцина, спермидина и кадаверина стимулирует биопленкообразование как у штаммов, способных к самостоятельному синтезу этих веществ, так и у мутантов. Эффект носит концентрационно-зависимый характер и возрастает от кадаверина к путресцину и спермидину.

Ключевые слова: полиамины, биопленкообразование.

Биопленки – это сложно организованные, структурированные сообщества микроорганизмов, формирующиеся на границе раздела сред. Бактериальные пленки, способные развиваться на любых поверхностях (искусственные клапаны сердца, водители ритма, протезы, глазные полимерные линзы и катетеры), в 65% случаев является причиной возникновения внутрибольничных инфекций. Система обмена информацией, экзополисахаридный матрикс и ряд физиологических особенностей, характерных для биопленок, делают микроорганизмы, включенные в их структуру, в 10-1000 раз менее чувствительными к антибактериальным препаратам, чем планктонные клетки [1]. Высокие адаптивные возможности позволяют микроорганизмам в составе биопленок быстро приспособиться к воздействию антибиотика, что обусловливает необходимость разработки новых технологий подавления их роста посредством воздействия на механизмы развития и регуляции биопленкообразования.

Биполенкообразование рассматривают как сложную реакцию микроорганизмов на стрессовые воздействия окружающей среды [2], поэтому поиск регуляторных факторов формирования бактериальных пленок логично начать среди уже установленных механизмов стрессового ответа. Одной из универсальных стрессовых реакций является накопление клеткой биогенных полиаминов, продуктов декарбоксилирования аминокислот, которые обеспечивают выживание микроорганизмов в условиях голодания по аммонию, под действием УФ излучения, антибиотиков, кислотного, окислительного, теплового и других видов стресса [2, 3, 4]. Интерес к полиаминам как возможным определяющим факторам биопленкообразования подкрепляется еще и тем, что человеческий организм, являясь средой обитания микроорганизмов, характеризуется высоким содержанием полиаминов в некоторых органах и тканях. Цель настоящей работы – исследование влияния экзогенного и эндогенного пула полиаминов на способность микроорганизмов к биопленкообразованию.

В работе были использованы профицитные штаммы *Escherichia coli* с нормально функционирующей системой синтеза полиаминов и дефицитные мутантные штаммы, способные лишь к транспорту этих веществ. Культивирование проводили в виалах 96-луночных иммунологических планшетов на LB бульоне, а также на декарбоксилазном (ДК) бульоне – аналоге LB, в состав которого не входят аминокислоты ли-

зин, аргинин и метионин, являющиеся предшественниками полиаминов кадаверина, путресцина и спермидина, соответственно. Для определения влияния полиаминов на биопленкообразование путресцин, кадаверин и спермидин добавляли в среду в концентрациях 0,1; 1; 10 мМ. Величину биопленкообразования оценивали по количеству красителя генциановиолета, аккумулированного биопленками [5]. Удельное биопленкообразование (УБ) рассчитывалось в пересчете на оптическую плотность культуры.

ДК – бульон, не содержащий предшественники полиаминов, оказался менее благоприятным условием для образования биопленок: культивирование профицитного штамма на средах LB и ДК показало, что величина удельного биопленкообразования выше на 30% при выращивании на среде, содержащей предшественники полиаминов. Внесение в среду культивирования каждого из исследованных полиаминов стимулировало биопленкообразование как полиамин-дефицитного, так и полиамин-профицитного штаммов. Эффективность действия полиаминов зависела от их концентрации: добавка спермидина в концентрации 0,1; 1 и 10 мМ увеличивали биопленкообразование профицитного штамма, выращенного на LB-бульоне, на 40, 58 и 125% соответственно.

При культивировании дефицитного штамма на полноценной среде LB внесение кадаверина, путресцина и спермидина в концентрации всего 0,1 мМ повышало биопленкообразование на 30, 50 и 79% соответственно. Более сильный положительный эффект полиаминов на полиамин-дефицитном штамме *E. coli*, очевидно, связан с отсутствием эндогенного пула полиаминов, маскирующего эффект экзогенных добавок. Представленные данные указывают также на различия эффектов разных полиаминов: стимуляция биопленкообразования полиаминами увеличивается от кадаверина к путресцину и спермидину.

Таким образом, полиамины являются важными факторами биопленкообразования: накопление этих веществ в среде, а затем и в клетке оказывает положительный эффект на способность *E. coli* образовывать бактериальные пленки.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 11-04-96001) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (номер гос. регистрации 01200963690).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson G.G.* Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2008. – V. 322. – P. 85–105.

2. *Landini P.* Cross-talk mechanisms between biofilm formation and response to environmental and physiological stresses in *Escherichia coli* // Research in Microbiology. – 2009. – V. 160. – P. 259–266.

3. *Tkachenko A.G.* Adaptive functions of *Escherichia coli* polyamines in response to sublethal concentrations of antibiotics // Microbiology. – 2009. – V. 78(1). – P. 25–32.

4. *Tkachenko A.G.* The role of natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *E. coli* // Arch. Microbiol. – 2001. – V. 176. – P. 155–157.

5. *Ткаченко А.Г.* Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов // Биохимия. – 2007. – Т. 72(1). – С. 128–136.

Shirokova O.A.[1,2], Nesterova L.U.[2], Tkachenko A.G.[1,2]

POLYAMINES ARE AN *ESCHERICHIA COLI* BIOFILM FORMATION REGULATORY FACTOR

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia,

olga.shirockova@gmail.com, agtkachenko@iegm.ru

[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,

UB RAS, Perm, Russia, larisa.nesterova@bk.ru

Summary. Polyamines` influence on *E. coli* ability to form biofilms was shown. Additions of putrescine, spermidine and cadaverine were found to have positive effect on biofilm formation both in normal strains, which were able to synthesize these polyamines, and in polyamine-deficient strains. This effect was developed in concentration-dependent manner and increased from cadaverine to putrescine and spermidine.

Key words: polyamines, biofilm formation.

УДК 579.22

Шумков М.С.[1], Гончаренко А.В.[2], Кылосова А.М.[1,3], Ткаченко А.Г.1,[3]

ПОЛИАМИНЫ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ldcC ESCHERICHIA COLI* В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, shumkov@iegm.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва, Россия, avg65@inbox.ru;

[3]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия, agtkachenko@iegm.ru

Резюме. С целью изучения экспрессии *ldcC* в условиях действия антибиотиков и определения роли полиаминов в её регуляции сконструированы штаммы *Escherichia coli* с транскрипционным и трансляционным *ldcC::lacZ* репортерными слияниями. Показано, что фторхинолоны вызывают повышение экспрессии *ldcC* на уровне транскрипции, в то время как β-лактамы, напротив, снижают её. Обнаружено, что природные полиамины путресцин и спермидин способны модулировать транскрипцию *ldcC*, действуя опосредованно через белок RpoS. На основе полученных данных выдвинуто предположение о роли LdcC как фактора адаптации *E. coli* к действию фторхинолоновых антибиотиков.

Ключевые слова: LdcC, RpoS, фторхинолоны, β-лактамы, полиамины.

Основным способом лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы уже более полувека является антибиотикотерапия. Однако в последнее время она всё чаще оказывается неэффективной вследствие широкого распространения антибиотикоустойчивых форм микроорганизмов. Это делает актуальным детальное изучение механизмов формирования антибиотикорезистентности с целью последующей разработки новых подходов к её профилактике.

Ранее мы показали, что сублетальное воздействие антибиотиков на *E. coli* приводит к значительному повышению внутриклеточной концентрации полиаминов и активации экспрессии *rpoS*, кодирующего глобальный регулятор общего стрессового ответа [1]. Наиболее выраженное возрастание этих параметров наблюдалось при добавке фторхинолонов, специфичным для которого было 20-кратное возрастание содержания клеточного кадаверина на фоне 5-кратного увеличения экспрессии *rpoS*. Причиной накопления кадаверина в этих условиях является повышенная активность ферментов его синтеза – лизиндекарбоксилаз LdcC и/или CadA [2]. Единственным известным регулятором экспрессии *ldcC* служит RpoS [3], содержание которого в клетках регулируется, в том числе при участии полиаминов [4]. Цель настоящей работы – изучение экспрессии *ldcC* в условиях действия антибиотиков и роли полиаминов, а также RpoS, в её регуляции.

Для достижения поставленной цели нами были сконструированы два типа *ldcC::lacZ* репортерных генных слияний, транскрипционное и трансляционное. Их внедрение в хромосому *E. coli* было осуществлено с использованием рекомбинантной системы pRS551(pRS552)/λRS45 [5]. Экспрессию *ldcC*, как и *rpoS*, определяли по активности β-галактозидазы [6]. *rpoS::lacZ* конструкция содержалась в штамме *E. coli* RO91, любезно предоставленном профессором R. Hengge (Freie Universität, Берлин, Германия). Антибиотики добавляли в сублетальных концентрациях, приводящих к 70% подавлению накопления биомассы через 5 часов культивирования.

Показано, что действие фторхинолонов вызывает возрастание экспрессии *ldcC* в 2,5 раза. В то же время, β-лактамные антибиотики приводят к 2-кратному её снижению. При этом сравнение профиля β-галактозидазной активности в штаммах с транскрипционным и трансляционным слияниями позволяет сделать вывод о преобладании транскрипционной регуляции экспрессии *ldcC* в данных условиях.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что полиами-

ны путресцин и спермидин (в 5 мМ концентрациях) также вносят свой вклад в регуляцию экспрессии *ldcC*. Они действуют преимущественно на уровне транскрипции и вызывают приблизительно 30% её возрастание при добавке β-лактамов. В культурах, подвергнутых действию фторхинолонов, экспрессия *ldcC* возрастает в 2 раза, но только при добавке путресцина. Спермидин, напротив, снижает транскрипцию до уровня контрольной культуры без антибиотика.

Сходным образом в описываемых условиях изменяется экспрессия *rpoS*: добавка путресцина в присутствии фторхинолонов вызывает 40% её повышение, а внесение спермидина приводит к падению экспрессии до контрольного уровня.

Вместе с тем, сохранение в культуре *E. coli* уровня биомассы в 2 раза более высокого, чем без полиаминов, было отмечено как при добавке спермидина, так и при внесении путресцина. Однако это наблюдалось только на фоне действия фторхинолонов. В присутствии β-лактамов влияния путресцина и спермидина на уровень накопления биомассы не отмечено.

Таким образом, подтверждена возможность регуляции экспрессии *ldcC* в ответ на действие факторов среды [2]. Показано, что её активация при действии фторхинолоновых антибиотиков осуществляется на транскрипционном уровне и зависит от RpoS. Природные полиамины путресцин и спермидин выступают в качестве модуляторов экспрессии *ldcC*, опосредованно изменяя её через RpoS, причём индукция экспрессии *ldcC* может рассматриваться как компонент адаптивного ответа *E. coli* на действие фторхинолоновых, но не β-лактамных, антибиотиков.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-99006-р-офи и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (номер гос. регистрации 0120096390).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В.* Адаптивные функции полиаминов при сублетальных воздействиях антибиотиков // Микробиология. – 2009. – Т. 78. №1. – С. 32–41.

2. *Ахова А.В., Ткаченко А.Г.* Лизиндекарбоксилазная активность как фактор резистентности *Escherichia coli* к фторхинолонам // Микробиология. – 2009. – Т. 78. №5. – С. 636–640.

3. *Lemonnier M., Lane D.* Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli* // Microbiology. – 1998. – V. 144. N.3. – P. 751–760.

4. *Ткаченко А.Г., Шумков М.С.* Роль путресцина в регуляции уровня σS-субъединицы РНК-полимеразы в клетках *Escherichia coli* при переходе к стационарной фазе // Биохимия. – 2004. – Т. 69. №8. – С. 1079–1087.

5. *Simons R.W., Houman F., Kleckner N.* Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions // Gene. – 1987. – V. 53. – P. 85– 96.

6. *Miller J.H.* Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. – 1992.

Shumkov M.S.[1], Goncharenko A.V.[2], Kylosova A.M.[1,3], Tkachenko A.G.[1,3]

POLYAMINES AS A FACTOR OF REGULATION OF *ESCHERICHIA COLI ldcC* GENE EXPRESSION UNDER ANTIBIOTIC TREATMENT

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, shumkov@iegm.ru;

[2]A.N. Bach Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, avg65@inbox.ru;

[3]Perm State National Research University, Perm, Russia, agtkachenko@iegm.ru

Summary. *Escherichia coli* strains harboring *ldcC::lacZ* operon and protein fusions were constructed to investigate *ldcC* expression changes under antibiotic treatments. Two-fold increase of *ldcC* transcription was observed in response to fluoroquinolones. Alternatively, β-lactams led to its two fold decrease. Both spermidine and putrescine were found to modulate *ldcC* expression at the level of transcription, being exerted their regulatory effects in an RpoS-dependent manner. On the basis the *ldcC* induction is supposed to be a component of the *E. coli* adaptive response to fluoroquinolones.

Key words: LdcC, RpoS, fluoroquinolones, β-lactams, polyamines.

УДК 579.8

Автух А.Н., Винокурова Н.Г., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Барышникова Л.М.

СОСТАВ ПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ КАК ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ВИДОВ РОДА *KRIBBELLA*

Всероссийская коллекция микроорганизмов, Учреждение Российской академии наук

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия, avtukh@rambler.ru

Резюме. Определен состав полярных липидов у 15 штаммов рода *Kribbella*, выделенных из различных почв разных регионов России и относящихся не менее чем к 13 новым видам. У всех изученных штаммов выявлены фосфолипиды PI, PC, PG и DPG (ранее описанные для рода *Kribbella*), а также липид неизвестной природы (L1). Кроме того, у всех штаммов обнаружены несколько других (минорных) полярных липидов в различных сочетаниях. Полученные данные позволяют сделать вывод, что состав полярных липидов может служить хемотаксономическим маркером не только рода *Kribbella*, но и его видов.

Ключевые слова: актиномицеты, род *Kribbella*, хемотаксономия, полярные липиды.

Введение

Род *Kribbella* [1] семейства *Nocardioidaceae* включает актиномицеты с хорошо развитым воздушным и субстратным мицелием (обычно фрагментирующемся на палочковидные элементы), *LL*-диаминопимелиновой кислотой в клеточной стенке и фосфатидилхолином в качестве диагностического фосфолипида. Особенностью видов этого рода является их высокая степень сходства по генам 16S рРНК (до 99,7%) при отсутствии надежных фенотипических признаков, разграничивающих близкие виды. Цель настоящей работы – исследование полярных липидов у 15 новых штаммов (таблица 1), абсолютное большинство из которых результатам анализа генов 16S рРНК и гиразы Б (*gyrB*) относятся к новым видам рода *Kribbella*, также оценка возможности использования состава полярных липидов для дифференциации видов данного рода.

Материалы и методы исследования

Штаммы выращивали на пептонно-дрожжевой среде (пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 3 г/л, глюкоза – 5 г/л, дигидрофосфат калия – 0,2 г/л, pH = 7,2) при 28°С в течение 1 сут. Полярные липиды экстрагировали смесью хлороформ–метанол (2:1) из лиофильно высушенной биомассы. Суммарный экстракт разделяли на пластинках HPTLC Silicagel 60F («Merck», Германия) методом двумерной хроматографии в системах: хлороформ–метанол–вода (65:25:4 об/об) и хлороформ–уксусная кислота–метанол–вода (80:15:12:5 об/об). Для обнаружения и идентификации полярных липидов использовали 5%-ный спиртовый раствор фосфорномолибденовой кислоты, б-нафтол, реактив Драгендорфа, «молибденовый голубой» по Диттмеру и 0,25%-ный раствор нингидрина в ацетоне [2].

У всех штаммов были выявлены фосфатидилинозит (PI), фосфатидилхолин (PC), фосфатидилглицерин (PG) и дифосфатидилглицерин (DPG), описанные ранее для известных видов рода *Kribbella*, а также полярный липид L1 неустановленной природы. Кроме того, у изученных штаммов обнаружены дополнительно по 2–5 других полярных липида, в их числе гликолипиды (G), фосфолипиды (PL) и липиды неизвестного состава (L) (см. таблицу 1, рис. 1).

Таблица 1.

Состав полярных липидов изученных штаммов

Штамм	Полярные липиды*									Источник выделения штаммов
ВКМ Ас-2540			G3		PL1			L1	L2	Почва, посадки малины, Мордовия
ВКМ Ас-2500	G1		G3	G4	PL1			L1	L2	Почва, луг, Мордовия
ВКМ Ас-2568	G1		G3	G4	PL1			L1		Почва, луг, г. Пущино, Моск. обл.
ВКМ Ас-2566	G1		G3	G4	PL1	PL2		L1		Почва, г. Воткинск, Удмуртия
ВКМ Ас-2527	G1		G3		PL1			L1		Каменистая почва, Сев. Кавказ
ВКМ Ас-2538	G1		G3		PL1			L1	L2	Почва, Оренбургская обл.
ВКМ Ас-2539	G1				PL1			L1	L2	Лиственный опад, г. Туапсе
ВКМ Ас-2541	G1				PL1			L1		Погребенная почва, г. Волгоград
ВКМ Ас-2574	G1				PL1			L1		Почва, луг, Воронежская обл.
ВКМ Ас-2569	G1	G2			PL1	PL2		L1	L2	Почва, берег ручья, Оренбург. обл.
ВКМ Ас-2572	G1	G2			PL1	PL2		L1	L2	Почва, луг, Калужская обл.
ВКМ Ас-2571	G1		G3					L1		Почва, луг, Воронежская обл.
ВКМ Ас-2570	G1		G3		PL1	PL2		L1		Почва, луг, Калужская обл.
ВКМ Ас-2573	G1	G2				PL2		L1	L2	Почва, Белгородская обл.
ВКМ Ас-2575	G1	G2					PL3	L1	L2	Почва, луг, Воронежская обл.

Примечание. *У всех штаммов обнаружены также PI, PC, PG и DPG.

Из всех изученных штаммов идентичные профили полярных липидов были обнаружены только для двух пар (ВКМ Ас-2569, ВКМ Ас-2572 и ВКМ Ас-2541, ВКМ Ас-2574); штаммы каждой пары принадлежали к разным видам. Липидные спектры штаммов ВКМ Ас-2500 и ВКМ Ас-2568 (99,9% сходства 16S рРНК; наиболее близки по генам *gyrB*) имели 9 идентичных компонентов. Интересно отметить, что штаммы ВКМ Ас-2566, ВКМ Ас-2569 и ВКМ Ас-2574, выделенные из разных почв и имеющие 100% сходства 16S рРНК, различались на видовом уровне по генам *gyrB* и имели различный состав полярных липидов.

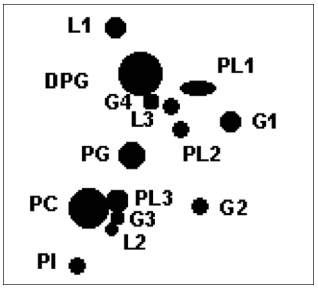


Рис. 1. Полярные липиды штаммов рода *Kribbella*.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что состав полярных липидов (при стандартизованных условиях анализа) может служить признаком, дифференцирующим виды (группы видов) рода *Kribbella*, как это было показано для видов рода *Microbacterium* [3].

Работа выполнена при поддержке грантов Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Park Y-H., Yoon J-H., Shin Y.K., Suzuki K-I., Kudo T., Seino A., Kim H-J., Lee J-S., Lee S.T.* Classification of "Nocardioides fulvus" IFO (now NBRC) 14399 and *Nocardioides* sp. ATCC 39419 in Kribbella gen. nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and Kribbella sandramycini sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49. – P. 743–752.

2. *Minnikin D.E., Collins M.D., Goodfellow M.* Fatty acid and polar lipid composition in the classification of Cellulomonas, Oerskovia and related taxa // J. Appl. Bacteriol. – 1979. – V. 47. – P. 87–95.

3. *Buczolits S., Schumann P., Valens M., Rossello-Mora R., Busse H.J.* Identification of a bacterial strain isolated from the liver of a laboratory mouse as Microbacterium paraoxydans and emended description of the species Microbacterium paraoxydans Laffineur et al. 2003 // Indian J. Microbiol. – 2008 – V. 48. – P. 243–251.

Avtukh A.N., Vinokurova N.G., Ariskina E.V., Dorofeeva L.V., Baryshnikova L.M.

POLAR LIPID COMPOSITION AS A CHEMOTAXONOMIC MARKER OF SPECIES IN THE GENUS *KRIBBELLA*

All-Russian Collection of Microorganisms, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia, avtukh@rambler.ru

Summary. Polar lipids were determined in 15 strains of the genus *Kribbella* isolated from different soils in various regions in Russia, which presumably belong to at least 13 new species according to 16S rRNA and gyrase B gene sequence analyses. All strains contained phospholipids PI, PC, PG and DPG reported to be characteristic of the genus *Kribbella*, and also an unknown lipid L1. Several additional minor polar lipids were found to occur in different combinations in the strains studied. The data obtained show that the polar lipid profiles serve as chemotaxonomic markers of both the genus *Kribbella* and the species it comprises.

Key words: actinomycetes, genus *Kribbella*, chemotaxonomy, polar lipids.

УДК 579.61, 579.862.1, 616-095, 616.21

Азнабаева Л.М.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ СТРЕПТОКОККОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ МИНДАЛИН ЧЕЛОВЕКА

Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза

Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, lkhus@yandex.ru

Резюме. Изучено биоразнообразие стрептококковой флоры микробиоценоза слизистой оболочки миндалин, выявлены виды, характерные для нормо- и патоценоза. Установлено, что характер модификации биологических свойств в ассоциациях зависел от состояния микробиоценоза: в патоценозах наблюдалось снижение персистентного потенциала стрептококков за счет взаимного подавления антилизоцимной (АЛА) и усиления гемолитической активностей (ГА), тогда как для нормоценоза было характерно индифферентное влияние симбионтов.

Ключевые слова: стрептококки, ассоциации, факторы патогенности.

Введение

Микробиоценозы тела человека отличаются разнообразием входящих в них представителей микрофлоры. Нормофлора является одним из компонентов, определяющих колонизационную резистентность организма хозяина [1]. Изучение таксономической структуры микробиоценоза любого биотопа является одним из важнейших разделов его микроэкологической характеристики и имеет значение для оценки стабильности биоценоза, прогнозирования возникновения и исхода заболевания, регуляции микробиоценоза [2].

Материалы и методы исследования

Обследовано 82 пациента, из них 50 больных хроническим компенсированным тонзиллитом в стадии ремиссии и 32 здоровых. Выделение и идентификацию штаммов микроорганизмов проводили на основании общепринятых методов [3]. Для идентификации использовали стандартные системы StreptoTest (LaChema, Чехия). У выделенных штаммов микроорганизмов изучена гемолитическая (ГА) [3], лизоцимная (ЛА) и антилизоцимная (АЛА) [4] активности. Межмикробные взаимодействия изучены согласно методике [5]. Материалы, полученные в результате экспериментальных исследований, были подвергнуты статистической обработке [6].

Результаты исследования и обсуждение

Выделено 127 штаммов стрептококков, относившихся к 14 различным видам, из них 70 штаммов (55,1±4,4%) изолированы из биоценоза здоровых и 57 штаммов (44,9±4,4%) – от больных. Установлено, что основными видами стрептококковой флоры здоровых людей были *Streptococcus acidominimus* (8,8±3,3%), *S. milleri* (11,4±3,7%), *S. mitior* (10,0±3,5%), *S. mutans* (18,6±4,6%), *S. oralis* (10,0±3,5%). Из биоценоза больных хроническим тонзиллитом высевались штаммы *S. milleri* (17,5±5,0%), *S. mutans* (15,8±4,8%), *S. oralis* (19,3±5,2%), *S. salivarius* (15,8±4,8%). Патогенный штамм стрептококка – *Streptococcus* pyogenes выделялся только из биоценоза больных хроническим тонзиллитом. Таким образом, штаммы видов *S. milleri, S. mutans* и *S. oralis* характерны для микробиоценоза слизистой оболочки миндалин как здоровых, так и больных тонзиллитом людей, это позволяет рассматривать их как доминантную микрофлору. Штаммы *S. acidominimus* и *S. mitior* были характерны только для биоценозов здоровых людей.

При изучении биологических свойств выделенных микроорганизмов, установлено, что ГА была характерна для 8,4±1,8% штаммов от здоровых и 10,0±1,9% штаммов от больных. ЛА характеризовались 9,6±1,9% штаммов от больных и 5,3±1,4% от здоровых. Фактором персистенции АЛА обладали 10,2±2,0% штаммов из микробиоценоза больных и 10,0±1,9% штаммов от здоровых людей. Одновременно два фактора патогенности проявлял небольшой процент изолятов (2,7±1,1-4,4±1,3%).

При оценке состояния любого микробиоценоза необходимо учитывать особенности симбиотических влияний ассоциантов. Изучалось взаимодействие между собой только штаммов, выделенных из одного биоценоза. Проанализирована модификация биологических свойств в 146 парах микроорганизмов. В патоценозах наблюдалось снижение персистентного потенциала стрептококков за счет взаимного подавления АЛА (19,0±6,0%), но происходило усиление гемолитической активности – основного фактора их вирулентности (19,0±6,0%), что могло определять развитие острого воспалительного процесса стрептококковой этиологии. Взаимодействие стрептококков, выделенных из экониши здоровых людей, характеризовалось индифферентным влиянием ассоциантов на экспрессию факторов патогенности и персистенции (88,5±3,1-95,2±2,1%), что свидетельствует о стабильности биоценоза в норме.

Исследования выполнены в рамках темы открытого плана НИР ИКВС УрО РАН «Формирование и функционирование микробных симбиозов в живых системах» (№ гос.регистрации 01201067427) и программы Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» (проект №09-П-4-1007).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бухарин О.В., Валышев А.В., Черкасов С.В.* Современные аспекты микробной экологии человека // Вестн. урал. мед. академ. науки. – 2006. – № 1. – С. 29–32.
2. Экология микроорганизмов человека / Под ред. акад. Бухарина О.В. – Екатеринбург: УрО РАН, 2006. – 480 с.
3. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. Биргер М.О. – М.: “Медицина”, 1986. – 464 с.
4. *Бухарин О.В., Валышев А.В., Елагина Н.Н., Черкасов С.В., Иванов Ю.Б.* Фотометрическое определение антилизоцимной активности микроорганизмов / Журн. микробиол. – 1997. – № 4. – С. 117–120.
5. *Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Хуснутдинова Л.М.* Некоторые особенности микрофлоры миндалин и межмикробного взаимодействия (в норме и при патологии) // Журн.микробиол. – 2000. – № 4. – С. 82–85.
6. *Герасимов А.Н.* Медицинская статистика. – М.: МИА, 2007. – 475 с.

Aznabaeva L.M.

STREPTOCOCCAL BIODIVERSITY IN HUMAN TONSIL MUCOSAL LINING

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, the Ural Branch,

RAS, Orenburg, Russia, lkhus@yandex.ru

Summary. Biodiversity of streptococcal flora in microbiocenosis of tonsil mucosal lining was studied. The species being typical of normo, - and pathocenosis were revealed. It was found that the character of biological properties' improvement in associations was dependent on a microbiocenosis state: in pathocenosis the decrease in streptococcal persistence potential was observed at the expense of mutual suppression. Normocenosis was characterized by indifferent influence of symbionts.

Key words: streptococci, associations, pathogenicity factors.

УДК 579.8

Бекшенева Л.Ф.[1], Дорофеева Л.В.[1], Ананьина Л.Н.[2], Ястребова О.В.[2], Присяжная Н.В.[1], Краузова В.И.[1], Демкина Т.С.[3], Тульская Е.М.[4]

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ШТАММОВ ВИДА *NOCARDIOIDES ALBUS*

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия, dorof@ibpm.pushchino.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, peg@iegm.ru;

[3]Учреждение Российской академии наук Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, г. Пущино, Россия, demkina@issp.serpukhov.su;

[4]Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», г. Москва, Россия, em_tulskaya@mail.ru

Резюме. Результаты анализа фрагментов генов 16S рРНК и MALDI/TOF масс-спектров 18 штаммов *Nocardioides albus*, а также данные изучения полиолов тейхоевых кислот клеточных стенок и уровня ДНК-ДНК сходства для отдельных представителей изученной группы показывают, что штаммы, относимые в настоящее время к *N. albus* на основании диагноза вида, представляют собой комплекс близкородственных видов.

Ключевые слова: актиномицеты, *Nocardioides albus*, клеточная стенка, таксономия.

Введение

Изучение биологического разнообразия и создание надежных систем классификации и идентификации микроорганизмов имеют важное значение как для развития фундаментальных областей науки, так и решения практических задач. Данные, накопленные в последние годы, ясно свидетельствуют, что ряд таксонов, описанных в «домолекулярный» период развития систематики, являются генетически гетерогенными и требуют ревизии. Неоднократно отмечалось также, что набор традиционно используемых фенотипических признаков явно недостаточен для разделения геномовидов на уровне фенотипа.

Представители рода *Nocardioides* широко распространены в природе, известны способностью к синтезу биологически активных соединений, трансформации стероидных соединений, деградации и полной деструкции высокотоксичных соединений, загрязняющих окружающую среду и т.д. Из более чем 50 известных в настоящее время видов этого рода, только два из них (*N. albus* и *N. luteus*) характеризуются наличием мицелия (распадающегося на палочковидные и кокковидные клетки). Виды различаются, главным образом, по окраске субстратного мицелия (белая у *N. albus* и желтая у *N. luteus*) [1]. Позднее было обнаружено, что типовые штаммы *N. albus* и *N. luteus* содержат разные тейхоевые кислоты (анионные полимеры, ковалентно связанные с пептидогликаном) – поли(галактозилглицефосфат) и поли(рибит-фосфат), соответственно [2, 3].

Целью настоящей работы было таксономическое изучение 18 штаммов (см. таблицу 1), отнесенных к виду *N. albus* по фенотипическим признакам, приведенным в диагнозе вида [1].

Материалы и методы исследования

Штаммы выращивали в течение 18 ч на среде ПДС [2]. Экстракцию ДНК, амплификацию генов 16S рРНК, секвенирование и филогегетический анализ, а также ДНК-ДНК гибридизацию и изучение MALDI/TOF масс-спектров клеток проводили, как описано ранее [4]. Выделение клеточных стенок и анализ ключевых компонентов тейхоевых кислот (полиолов) проводили согласно методам, приведенным в работах Шашкова с соавт. [2, 3].

Результаты и обсуждение

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК (с 126 по 858 нуклеотид согласно нумерации *E. coli*) показал, что штаммы образуют плотный кластер вместе с типовыми штаммами видов *N. albus* ВКМ Ac-805T и *N. luteus* ВКМ Ac-1246T. При этом ряд штаммов (подкластер 1) были более близки к *N. albus* (99,9% сходства), а другие занимали промежуточное положение (подкластер 2) между типовыми штаммами *N. albus* и *N. luteus* (уровни сходства 99,7% и 99,6% соответственно). Результаты MALDI/TOF масс-спектрометрии выявили наличие нескольких штаммов (групп штаммов), разделяющихся на дендрограмме приблизительно на уровне разделения типовых штаммов *N. albus* и *N. luteus*. Изучение состава анионных полимеров клеточной стенки у 6 представителей различных филогенетических и MALDI/TOF групп показало, что штаммы содержат рибит (аналогично типовому штамму *N. luteus* [3]). Уровни сходства геномной ДНК беспигментных рибит-содержащих штаммов (ДНК-ДНК гибридизация) и типового штамма *N. albus* – 32-53%. Полученные данные, а также сведения из литературы о разном составе полиаминов у других представителей вида *N. albus*, уровне таксономического разрешения MALDI/TOF спектров и высокой таксономической значимости состава тейхоевых кислот клеточных стенок и их структурных компонентов, позволяют заключить, что вид «*N. albus*» представляет собой комплекс близкородственных видов, трудно различимых по фенотипическим признакам, традиционно используемым для дифференциации *N. albus* и *N. luteus*.

Таблица 1.

Изученные штаммы, источники их выделения и характеристики.

Штаммы	Источник и регион выделения	Цвет	Полиол	Геногруппа
N. albus ВКМ Ac-805T	Почва, Венгрия	Белый	Глиц.	1
N. albus ВКМ Ac-806	Почва, Германия	Белый	Рибит	
N. albus 38186	Почва, Серпухов, Московская обл.	Белый	Рибит	
N. albus 44571	Погребенная почва, курган, Калмыкия	Белый		
N. albus 43724	Вулканическая грязь, Таманский п-ов	Белый		
N. albus 38137	Почва, луг, Саратовская обл.	Белый		2
N. albus ВКМ Ac-562,564,567, 568	Почва, Московская обл.	Белый	Рибит	
N. albus 43638	Почва на кострище, Мордовия	Белый		
N. albus 38157	Почва, чернозем, Ростовская обл.	Белый		
N. albus 38273, 38447, 38604	Почва, берег р. Кубань, Краснодарский край	Белый		
N. albus 38678	Почва, Южный Урал	Белый		
N. albus 44143, 44409, 44146	Погреб. почва, курганы, Волгоградская обл.	Белый		
N. luteus ВКМ Ac-1246T	Почва, Судан	Желтый	Рибит	3

Работа выполнена при поддержке грантов Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Prauser H.* Genus Nocardioides Prauser 1976 // In: Williams,

Sharpe and Holt (Editors), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Williams & Wilkins, Baltimore, 1989. – V. 4. – P. 2371–2375.

2. *Шашков А.С., Тульская Е.М., Евтушенко Л.И., Наумова И.Б.* Тейхоевая кислота клеточной стенки *Nocardioides albus* ВКМ Ас-805Т // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 1544–1549.

3. *Шашков А.С., Тульская Е.М., Евтушенко Л.И., Грачев А.А., Наумова И.Б.* Структура тейхоевой кислоты клеточной стенки *Nocardioides luteus* ВКМ 1246Т // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 505–510.

4. P*lotnikova E.G., Anan'ina L.N., Krauzova V.I., Ariskina E.V., Prisyazhnaya N.V., Lebedev A.T., Demakov V.A., Evtushenko L.I. Thalassospira permensis* sp. nov., a novel halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing consortium // Микробиология. – 2011. – V. 80. – P. 703–712.

Beksheneva L.F.[1], Dorofeeva L.V.[1], Anan'ina L.N.[2], Yastrebova O.V.[2], Prisyazhnaya N.V.[1], Krauzova V.I.[1], Demkina T.S.[3], Tul'skaya E.M.[4]

HETEROGENEITY AMONG STRAINS OF THE SPECIES *NOCARDIOIDES ALBUS*

[1]G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Russia, dorof@ibpm.pushchino.ru;

[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, peg@iegm.ru;

[3]Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Pushchino, Russia, demkina@issp.serpukhov.su;

[4]Moscow State University, Moscow, Russia, em_tulskaya@mail.ru

Summary. Analysis of partial 16S rRNA gene sequences and MALDI/TOF mass spectra of 14 *Nocardioides albus* strains, and the data on structural components of cell wall teichoic acids and DNA-DNA hybridization of representatives of the group considered provide evidence that organisms affiliated recently to *N. albus* according to the species diagnosis represent a complex of closely related species.

Key words: actinomycetes, *Nocardioides albus*, cell wall, taxonomy.

УДК 582.281

Бокарева Д.А.[1], Галанина Л.А.[1], Сергеева Я.Э.[1], Мысякина И.С.[1], Усов А.И.[2], Феофилова Е.П.[1]

СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ КАК КРИТЕРИЙ В СИСТЕМАТИКЕ И ФИЛОГЕНИИ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, г. Москва, Россия, andr-di@mail.ru, yanaes2005@yandex.ru, myssiakina@inmi.ru, feofilov@inmi.host.ru;

[2]Учреждение Российской академии наук Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва, Россия, usov@ioc.ac.ru

Резюме. В целях уточнения систематики порядка *Mucorales* изучен углеводный и липидный состав клеточных стенок (КС) у активно растущих и покоящихся клеток (спор и зигот) представителей 3-х семейств: *Cunningamellaceae, Choanephoraceae* и *Mucoraceae*, наиболее значимых в биотехнологии. Установлено сходство в составе углеводов КС спор у всех изученных грибов (основные сахара – глюкоза и галактоза) и выявлены существенные различия в составе их углеводов и липидов в КС мицелия (в содержании нейтральных сахаров и пентоз, нейтральных и полярных липидов). Эти данные могут быть использованы для ревизии систематики порядка *Mucorales*.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, хемотаксономия, филогения, углеводы, липиды.

Введение

В последние годы наряду с традиционными методами (морфологические, физиолого-биохимические, онтогенетические, экологические и генетические критерии), применяемыми в хемотаксономии и филогении грибов, все чаще используются данные о химическом составе клеток или отдельных органелл. При этом все большее число работ посвящается исследованию не только углеводного, но и липидного состава микроорганизмов.

В последнее десятилетие в центре внимания микологов находится представители порядка *Mucorales* отдела *Zygomycetes*, что связано с их природной деятельностью, патогенностью и перспективой использования в биотехнологии. В 70-е годы прошлого столетия при исследовании клеточной стенки (КС) грибов рода Mucor были установлены закономерности, отличающие мукоровые грибы от других грибов царства *Fungi*. В процессе онтогенеза этих грибов происходят изменения в составе КС: в споре преобладают глюкан и меланин, в мицелии – мукоран и хитозан. Мукоран – полимер КС мицелия, в его составе основным сахаридом является фукоза и уроновые кислоты. При прорастании споры её КС лизируется, а КС мицелия образуется *de novo*. Эти изменения получили название «онтогенетической рекапитуляции филогенетической истории КС» грибов порядка *Mucorales*. Порядок *Mucorales* в последние годы подвергается наибольшей ревизии со стороны микологов-таксономистов. Цель настоящего исследования – сравнительное изучение состава КС грибов этого порядка. В задачу исследования входило сравнение моносахаридного и липидного состава КС грибов на стадии мицелия и зрелых спор (спорангиоспор, конидий и зигоспор).

Материалы и методы исследования

В работе использовали гетероталличные штаммы *Cunninghamella japonica* (синоним – *C. echinulata*) ВКМ F-470(-), ВКМ F-471(+), ВКМ F-776(-), ВКМ F-775(+), ВКМ F-626(-), ВКМ F-1204(-), *C. homotalica* ВКМ F-930 (семейство *Cunninghamellaceae*) и *Absidia coerulea* ВКМ F-858 (+) и ВКМ F-859 (-), *Mucor hiemales* F-1431 (семейство *Mucoraceae*), оба семейства входят в порядок *Mucorales*, *Penicillium roqueforti* ВКМ F-3057, относящийся к сумчатым грибам аскомицетного аффинитета (семейство *Trichocomaceae*) и гетероталличные штаммы *Blakeslea trispora* T(+) и T(-) (семейство *Choanephoraceae*) из коллекции ИНМИ РАН. Методы культивирования, выделения КС, определения углеводов и липидов описаны в [1].

Результаты и обсуждение

Основные отличия в составе моносахаридов КС у грибов, принадлежащих к изучаемым семействам, выявляются только в период активного роста, то есть на стадии мицелия. Отмечены существенные различия в составе КС мицелия грибов: преобладающим моносахаридом у *C. japonica* была глюкоза, у *A. coerulea* – фукоза, у *B. trispora* – пентозы (ксилоза). Представляет интерес тот факт, что у *M. hiemalis* в составе углеводов преобладает глюкоза, содержание которой в 8-9 раз больше, чем фукозы, причем это отмечается как у мицелиального, так и дрожжевого морфотипа. В то же время по существующим представлениям этот гриб является типичным представителем семейства *Mucoraceae* (род *Mucor*) и в составе его углеводов основным сахаром должна быть фукоза, входящая в полимер мукоран. Таким образом, сравнение моносахаридного

состава КС мицелия свидетельствует о существенной разнице между грибами – представителями семейств *Choanephoraceae, Cunninghamellaceae* и *Mucoraceae*. При этом состав моносахаров *C. japonica* очень сходен с таковым гриба аскомицетного аффинитета *P. roqueforti*.

У всех исследованных грибов состав КС спор практически идентичен, основными моносахарами являются глюкоза и галактоза. В то же время состав углеводов другой покоящейся структуры – зиготы, например, *A. coerulea*, очень напоминает состав ее мицелия, и основным сахаром является фукоза, что может свидетельствовать о более позднем возникновении полового процесса в филогении *Mucorales*. Кроме того, состав ацильных цепей липидов, который в настоящее время является одним из ведущих хемосистематических признаков, также показывает, что *C. japonica* отличается по жирнокислотному составу липидов от других представителей порядка *Mucorales*, например, *Blakeslea trispora*, по соотношению ацилов C18:1/C18:2 в составе общих липидов и фосфолипидов. Для всех исследованных представителей *Mucorales* характерно более высокое содержание липидов в целых клетках, чем в КС. Однако в составе липидов представителей отдельных семейств порядка *Mucorales* обнаружены отличия, так, у *C. japonica* в нейтральных липидах КС мицелия преобладают триацилглицерины, а в фосфолипидах – фосфатидная кислота, у *A. coerulea* в КС мицелия не обнаружен фосфатидилинозит.

Выводы

В результате проведенных исследований получены данные, свидетельствующие о несомненной значимости изучения состава КС с позиций хемотаксономии для систематики *Mucorales*. Полученные сведения могут быть использованы при систематической ревизии этого порядка.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 09-04-00430 и 10-04-00659.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андриянова Д.А., Сергеева Я.Э., Кочкина Г.А., Галанина Л.А., Усов А.И., Феофилова Е.П.* Выделение клеточных стенок мицелиальных грибов на различных стадиях онтогенеза и изучение их углеводного состава // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011 – Т. 47. – № 4. – С. 448–454.

Bokareva D.A.[1], Galanina L.A.[1], Sergeeva Ya.E.[1], Mysyakina I.S.[1], Usov A.I.[2], Feofilova E.P.[1]

CELL WALL COMPOSITION OF MYCELIAL FUNGI AS A SYSTEMATIC AND PHYLOGENETIC CRITERION

[1]Winogradskii Institute of Microbiology, RAS, Moscow, Russia, andr-di@mail.ru, yanaes2005@yandex.ru, myssiakina@inmi.ru, feofilov@inmi.host.ru;

[2]Zelenskii Institute of Organic Chemistry, RAS, Moscow, Russia, usov@ioc.ac.ru

Summary. In order to elucidate the systematics of the order *Mucorales*, we investigated the carbohydrate and lipid compositions of the cell walls (CWs) of actively growing and dormant cells, spores and zygotes, of representatives of the three families (*Cunningamellaceae*, *Choanophoraceae*, and *Mucoraceae*) that hold special value for biotechnology. We revealed a similarity in the carbohydrate composition of spore CWs of all tested fungi, with glucose and galactose as predominant sugars. Significant differences in the composition of the carbohydrates (neutral sugar and pentose contents) and the lipids (neutral and polar lipid contents) were detected. These data give us grounds for revising the systematics of the order *Mucorales*.

Key words: mycelial fungi, chemotaxonomy, phylogeny, carbohydrates, lipids.

УДК 616.98:579.834.114

Боргояков В.Ю.[1], Васькова А.А.[2]

ВЫЯВЛЕНИЕ БОРРЕЛИЙ В КЛЕЩАХ, СОБРАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2009-2010 гг.

[1]Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия, ternsu@gmail.com;

[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия, ann.vaskova@gmail.com

Резюме. Проведено выявление ДНК боррелий в клещах снятых с людей, обратившихся за помощью в пункт вакцинопрофилактики, расположенный в Новосибирском научном центре СО РАН (ННЦ СО РАН). Общая зараженность клещей боррелиями и отдельными видами, в частности, в 2010 году уменьшилась по сравнению с 2009 годом. Процент зараженности клещей двумя видами боррелий одновременно наоборот увеличился. Наиболее часто в клещах в 2009 и в 2010 году выявляется ДНК *B. garinii*. Самый большой процент боррелий обнаружен в окрестностях ННЦ СО РАН.

Ключевые слова: боррелиоз, *Borrelia garinii, Borrelia afzelii, Borrelia miyamotoi*.

Введение

Проблема заболеваний, переносимых иксодовыми клещами, в последние годы приобретает все большее значение для многих регионов России. На территории Новосибирской области основное эпидемиологическое значение среди природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, занимают клещевой энцефалит и иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ). ИКБ - инфекционное заболевание, вызываемое спирохетами рода *Borrelia* [1]. Эффективность ранней диагностики боррелиоза сильно зависит от разнообразия видового состава боррелий отдельного региона, и повышение ее является задачей, представляющей как научный, так и практический интерес. Целью данной работы было выявление и установление видовой принадлежности боррелий, а также сравнение зараженности клещей в течение двух сезонов.

Результаты исследования и обсуждение

Установление видовой принадлежности показало, что наиболее часто в исследованных образцах выявлена ДНК *B. garinii* (табл. 1). Зараженность клещей *B. garinii* и *B. miyamotoi* достоверно ниже как в 2009, так и в 2010 году. Одновременное заражение клещей боррелиями двух видов было выявлено в 1,7% случаев в 2009 году и 2,3% случаев в 2010 году. Чаще всего встречается одновременное присутствие ДНК *B. miyamotoi* и *B. garinii* ($p<0,01$), реже всего – *B. miyamotoi* и *B. afzelii* ($p<0,01$) (таблица 1). В 2009 и 2010 годах в 0,2% и 0,7% образцов таежных клещей соответственно показано наличие ДНК *B. garinii* и *B. afzelii*. По сравнению с 2009 годом, в 2010 году уменьшилась как общая зараженность клещей, так и зараженность отдельными видами. Так, зараженность клещей видом *B. garinii* уменьшилась почти на 4%, а видом *B. afzelii* – на 1,5%. Зараженность же видом *B. miyamotoi* наоборот, увеличилась почти на 0,5%. В 2010 году также вырос процент выявления ДНК двух видов боррелий в одном клеще.

Таким образом, показано, что на территории Новосибирской области широкое распространение имеют не только виды комплекса *B. burgdorferi s.l.: B. garinii* и *B. afzelii*, но и вид *B. miyamotoi*, относимый к группе КВЛ.

Таблица 1.

Результаты установления видовой принадлежности боррелий

Год	Число исследов./положит.	Число положительных образцов / %±mp* от числа положительных образцов					
		Bg	Ba	Bm	Bm+Bg	Bm+Ba	Bg+Ba
2009	1350/345	268/19,9±1,1	39/2,9±0,5	15/1,1±0,3	17/1,3±0,3	3/0,2±0,1	3/0,2±0,1
2010	926/200	150/16,2±1,2	12/1,3±0,4	16/1,7±0,4	14/1,5±0,4	1/0,1±0,1	6/0,7±0,3

При анализе географического распределения мест, в которых произошло присасывание клещей в Новосибирской области, выделены следующие территориальные единицы: ННЦ – научный центр и его окрестности, НСК – г. Новосибирск и его ближайшие окрестности, НСО – административные районы Новосибирской обл., удаленные от г. Новосибирска и ННЦ СО РАН. Анализ клещей, показал, что наибольший процент ДНК боррелий обнаружен в клещах, снятых с людей, подвергшихся нападению в ННЦ (таблица 2). Наименьший процент положительных образцов, выявлен в клещах, снятых с людей, подвергшихся нападению на территории НСО в 2009 году и на территории НСК в 2010. Следует обратить внимание, что по сравнению с другими число исследованных клещей из НСК значительно меньше, поэтому в данной работе мы не можем говорить о достоверных различиях между НСК и другими территориальными единицами. В то же время можно говорить о наличии достоверных отличий в количестве положительных проб клещей, снятых в ННЦ и НСО ($p<0,01$).

Таблица 2.

Локации, в которых выявлены положительные образцы

Год	Число исследов./положит.	Число положительных образцов / %±mp* от числа положительных образцов		
		ННЦ	НСК	НСО
2009	1110/293	221/29±1,4	21/25±1,2	51/19,3±1,2
2010	837/180	97/27,3±1,5	19/15,6±1,3	16/17,7±1,3

Суммируя все выше сказанное можно предположить, что один из очагов ИКБ Новосибирской обл. находится в окрестностях ННЦ СО РАН и по мере удаления от него число зараженных клещей постепенно снижается. Это может быть связано как с природными особенностями местоположения ННЦ, так и с влиянием антропогенных факторов. В настоящее время в ННЦ и территориях, прилегающих к нему, не осталось мест, не испытавших воздействие человека, что привело к большей активности грызунов, являющихся основными переносчиками и резервуарами боррелий и, как следствие, увеличение числа инфицированных клещей [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В.* Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов России // Паразитология. – 2002. – № 3. – С. 177-191.

2. *Коренберег Э.И.* Современные черты природной очаговости клещевого энцефалита: новые или хорошо забытые? // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2008. – № 3. – С. 3–8.

Borgoyakov V.Ju.[1], Vaskova A.A.[2]

STUDY OF BORRELIA IN TICKS COLLECTED IN NOVOSIBIRSK REGION WITHIN THE PERIOD FROM 2009 TO 2011

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, ternsu@gmail.com;

[2]Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia, ann.vaskova@gmail.com

Summary. In our study, *Borrelia* were revealed in ticks removed from people who asked for help in the vaccination center located in Novosibirsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (NSC SB RAS). Common infectiousness of ticks by *Borrelia* and individual species particularly decreased in 2010 in comparison with 2009. Percentage of tick infection with two different species of *Borrelia* on the contrary increased. DNA of species *B. garinii* was found most often in ticks. The largest percentage of *Borrelia* was detected in the vicinity of the NSC SB RAS.

Key words: borreliosis, *Borrelia garinii, Borrelia afzelii, Borrelia miyamotoi*.

УДК 579.8

Гладких А.С.[1], Белых О.И.[1], Левина О.В.[2], Парфенова В.В.[1]

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ СООБЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ОЗЕРА БАЙКАЛ

[1]Учреждение российской академии наук Лимнологический Институт Сибирского отделения РАН, г. Иркутск, Россия, gladkikh@lin.irk.ru, belykh@lin.irk.ru, parf@lin.irk.ru;

[2]Учреждение российской академии наук Институт геохимии им. А.П.Виноградова Сибирского отделения РАН, г. Иркутск Россия, levina@igc.irk.ru

Резюме. С помощью пиросеквенирования впервые изучены сообщества биопленки и планктона литоральной зоны оз. Байкал. Получено около 12000 новых последовательностей микроорганизмов. Сообщества биопленки и планктона имеют разный видовой состав: в биопленке доминируют цианобактерии, в планктоне – актинобактерии, бактероиды и протеобактерии. Настоящее исследование позволило выявить редкие филы, которые не были детектированы ранее. Выявлено большое количество последовательностей некультивируемых микроорганизмов, не имеющих близких гомологов в мировых базах данных.

Ключевые слова: метагеномный анализ, 16S рРНК, пиросеквенирование.

Введение

Озеро Байкал – уникальная пресноводная экосистема со своеобразным гидрологическим и гидрохимическим режимом. Несмотря на многолетние наблюдения, его микробное сообщество изучено недостаточно. В связи с развитием методов секвенирования ДНК в последнее десятилетие был выработан новый подход получения общего генетического ресурса или «метагенома» микробного сообщества. Метаге-

номный анализ – новый метод, предназначенный для изучения микробного сообщества в отдельно взятой экологической нише.

Целью работы было определение структуры сообществ воды и биопленки, образовавшейся на искусственном субстрате оз. Байкал методом пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК. В настоящей работе мы использовали технологию пиросеквенирования как наилучшую на сегодняшний день для изучения биоразнообразия и особенностей микробных сообществ.

Материалы и методы исследования

Материал для исследования был отобран в прибрежной зоне оз. Байкал в районе пос. Б. Коты в июне 2010 года. Водолазом с глубины 5 метров была поднята металлическая пластина, которая находилась на дне озера в течение 5 лет. Также в литоральной зоне озера была взята проба воды. Метагеномное секвенирование по гену 16S рРНК произведено на приборе Roche/454 Genome Sequencer FLX Titanium (Сеул, Корея). Для оценки видового разнообразия сообществ, характеристики их таксономического состава и сравнительного анализа использовали Pyrosequencing pipeline (http://pyro.cme.msu.edu).

Результаты и обсуждение

В результате пиросеквенирования из биопленки была получена 6291 последовательность гена 16S рРНК длиной более 300 нуклеотидов. Из них 5074 (80,7%) последовательностей принадлежат представителям домена Bacteria, 1217 (19,3%) – представителям Eukaryota, представители домена Archea не выявлены. Средняя длина анализируемых последовательностей составила 430 нуклеотидов. Используя 97% порог сходства нуклеотидных последовательностей, в сообществе было определено 552 филотипа (OTU), принадлежащих 15 бактериальным филам. В сообществе биопленки наблюдали доминирование автотрофных фотосинтетиков – представителей филы Cyanobacteria (2228 последовательностей, 43,3%, 27 родов), среди которых коккоидные цианобактерии *Chamaesiphon* sp. были наиболее многочисленные. В ходе анализа в биопленке было обнаружено 1113 последовательностей диатомовых водорослей.

В пробе, отобранной в литоральной зоне оз. Байкал, в результате пиросеквенирования было выявлено 5525 последовательностей гена 16S рДНК длиной более 300 нуклеотидов, из них 5031 (91,1%) принадлежали представителям домена Bacteria, а 494 (8,9%) – Eukaryota, представители домена Archea в планктонной пробе также не выявлены. Средняя длина анализируемых последовательностей составляла 470 нуклеотидов. Проба воды по сравнению с биопленкой характеризуется большим видовым разнообразием, количество выявленных OTU, составило 888, которые принадлежали 28 филам домена Bacteria. В планктоне доминирующими по количеству родов были 3 филы: Actinobacteria (1448 последовательностей, 31 род, 23,7%), Bacteroidetes (1635 последовательностей, 52 рода, 32,9%) и Proteobacteria (1191 последовательность, 196 родов, 28,8%). Доминирующие филотипы в воде – *Flavobacterium* (768 последовательностей) и *Planktophila* (642 последовательности). В отличие от биопленки, преобладания цианобактерий не наблюдали, они представлены только 129 последовательностями (2,3%). Таким образом, большинство выявленных в литорали озера Байкал групп микроорганизмов по типу обмена относятся к хемоорганогетеротрофам, фотосинтетическая продукция в прибрежной части осуществляется цианобактериями и бактериями фил Chlorobi и Chloroflexi. Диатомовые водоросли были представлены 283 последовательностями.

Впервые методом параллельно пиросеквенирования удалось подробно описать таксономический состав и количественное соотношение разных групп микроорганизмов в биопленке и планктоне озера Байкал. Наше исследование выявило высокое разнообразие микроорганизмов в двух сообществах. Ранее молекулярные методики позволяли выявить в толще воды не более 10 групп бактерий. С применением методики пиросеквенирования количество описанных в планктоне фил увеличилось до 28. К тому же были выявлены минорные группы микроорганизмов, представленные всего несколькими последовательностями, которые, вероятно, невозможно было выявить другими молекулярными методами. Пиросеквенирование позволило получить большое количество последовательностей, не имеющих близких гомологов в мировой базе последовательностей. Это могут быть новые виды, которые нигде не были описаны ранее.

Работа выполнена в рамках базового проекта «Особенности формирования и жизненная стратегия микробного сообщества и вирусов в биопленках в оз. Байкал» № VI.51.1.9 (Учреждение российской академии наук Лимнологический Институт СО РАН).

Gladkikh A.S.[1], Belykh O.I.[1], Levina O.V.[2], Parfenova V.V.[1]

METAGENOMIC ANALYSIS OF THE BACTERIAL COMMUNITIES FROM LAKE BAIKAL

[1]Limnological Institute of SB RAS, Irkutsk, Russia gladkikh@lin.irk.ru, belykh@lin.irk.ru, parf@lin.irk.ru;

[2]A.P. Vinogradov Institute of Geochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia, levina@igc.irk.ru

Summary. Microbial communities of biofilm and plankton in the Lake Baikal was studied for the first time with the use of pyrosequencing of the 16S rRNA gene. We obtained almost 12000 new sequences of microorganisms from the Lake Baikal. Communities of biofilm and plankton in Lake Baikal have different species compositions: dominant group in the biofilm is Cyanobacteria, in plankton – are Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria. Our study contributed to a list a substantial number of bacterial sequences for Lake Baikal, allowed to detect rare phyla that have never been detected before. Furthermore, our study reported a non-negligible proportion of unclassified reads. They may represent novel species that have never been reported from other water bodies or elsewhere and certainly deserve further examination.

Key words: metagenomic analysis, 16S rRNA, pyrosequencing.

УДК 631.46+576

Горбачева М.А., Полянская Л.М.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ ПО ИХ РАЗМЕРАМ В АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ В ЧЕРНОЗЕМЕ В ХОДЕ МИКРОБНОЙ СУКЦЕССИИ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова”, Москва, Россия, lpolyanskaya@mail.ru

Резюме. Изучено распределение бактерий по их размерам в ходе микробной сукцессии в разных слоях и горизонтах чернозема в аэробных и анаэробных условиях. Показано, что в аэробных условиях доминируют бактерии с размерами 0,23; 0,38 мкм, а в анаэробных условиях дополнительно обнаруживаются бактерии размером 0,17 мкм. Сделано предположение о том, что в анаэробных условиях рост бактерий происходит за счет увеличения численности мелких форм бактерий.

Ключевые слова: бактерии, размер, аэробные и анаэробные условия, микробная сукцессия.

Введение

В последние годы XX столетия особое внимание было обращено на мельчайшие формы жизни на нашей планете – бактерии, имеющие размеры, измеряемые нанометрами. Р.Л. Фолк [1] называет нанобактериями карликовые (миниатюрные) формы с диаметром 0,05-0,2 мкм. Теоретические расчеты, основанные на содержании в клетках минимального количества ДНК, энзимов, липидов и рибосом, показывают на невозможность существования живых клеток в диаметре меньше, чем 0,3 мкм. Есть сведения [2, 3] о том, что теоретически минимальный диаметр для живой клетки может быть около 0,14 мкм. Причем для компактного размещения всех необходимых для клетки компонентов нужна сферическая форма [4]. По мнению некоторых ученых, для самоpепликации и основного метаболизма клеток нужно приблизительно 250 генов. Это половина известного в настоящее время самого маленького бактериального генома. Исходя из этого, шаровидная клетка может быть 100 нм в диаметре, а добавив к этому место для рибосом и других структур, получим 200 нм. По расчетам [5], диаметр сферической клетки может быть всего 50 нм. Однако, во многих образцах из озер, рек, почвы, снега и дождевой воды с помощью эпифлюоресцентного микроскопа обнаружены бактериальные клетки, имеющие наименьший (0,2 мкм) диаметр [4].

Материалы и методы исследования

Определение размеров бактерий проводили методом “каскадной” фильтрации с помощью колбы Бунзена с использованием ядерных фильтров с диаметром пор 1,85; 0,43; 0,38 и 0,23 мкм и мембранных фильтров “Synpor” с диаметром пор 0,17 мкм. Собственную люминесценцию фильтров гасили окрашиванием насыщенным спиртовым раствором Судана черного. Исследовали распределение бактерий в образцах почвы – чернозема типичного пахотного (Курский НИИАП). Динамику численности бактерий по их размерам изучали в двух верхних слоях гор. А и гор. В чернозема.

Результаты и обсуждение

В аэробных условиях велика численность бактерий с размерами 0,38 и 0,23 мкм на 7-14 сут, а в анаэробных условиях – на 7 сут опыта. В аэробных условиях общая численность бактерий в верхнем слое гор. А на 7-14 сут эксперимента составляла около 1 млрд. кл/г почвы, в анаэробных условиях на 7 сут достигала 2,0 млрд./г. В аэробных условиях доминировали бактерии с размерами 0,23 и 0,38 мкм, в анаэробных условиях дополнительно обнаруживались бактерии с размером 0,17 мкм.

В нижнем горизонте В общая численность бактерий на 7 сут опыта также была велика в аэробных условиях и составляла более 1 млрд. кл/г почвы, в анаэробных условиях их численность была несколько выше (1 млрд. и 181 млн. кл/г почвы), среди которых доминировали бактерии с размерами 0,38 и 0,23 мкм.

Нами было изучено распределение бактерий по размеру на всех стадиях микробной сукцессии в верхнем и нижнем слое горизонтов А и В в аэробных и анаэробных условиях. Показано, что распределение бактерий с размерами 0,43 и 0,17 мкм в верхнем слое почвы слабо различается в ходе микробной сукцессии как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Распределение бактерий с размерами 0,23 мкм отличалось только в анаэробных условиях на 30-е сут опыта, где их численность составляла около 70%. В отличие от предыдущего слоя возрастала численность бактерий с размерами 0,43 мкм и 0,17 мкм в аэробных и анаэробных условиях. В этом слое численность бактерий с размерами 0,23 мкм возрастала на 14–30 сут опыта в аэробных условиях, а в анаэробных с 3-х сут и до конца опыта. В анаэробных условиях к концу опыта численность бактерий мелких фракций значительно преобладала.

Общая биомасса бактерий в аэробных условиях в верхнем слое гор. А была максимальной (3,0 мкг/г почвы) на 7–14-е сут, в гор. В – выше в 2 раза на 7 сут опыта (см. рисунок). В анаэробных условиях на 7 сут биомасса бактерий составляла (6,0 мкг/г почвы) в обоих горизонтах. При исследовании распределения биомассы бактерий всех фракций в гор. А и гор. В установлено, что в горизонте А и гор. В доминирует биомасса бактерий с размерами 0,38 и 0,43 мкм как в аэробных условиях, так и в анаэробных условиях на 7 сут опыта, при этом в горизонте В в анаэробных условиях обнаруживались бактерии с размерами 0,23 мкм.

В обоих слоях чернозема в аэробных условиях по биомассе доминировали бактерии с размерами 0,43 и 0, 38 мкм, а в анаэробных условиях обнаруживались бактерии с размерами 0,23 мкм. Процент биомассы бактерий с размерами 0,43 мкм был велик только в начале (0-3 сут) опыта в обоих горизонтах, а процент биомассы бактерий с размерами 0,38 мкм возрастал до 70% в гор. В в аэробных и анаэробных условиях.

Выводы

В результате проведенных исследований изучено распределение бактерий по их размерам в ходе микробной сукцессии в разных слоях и горизонтах чернозема в аэробных и анаэробных условиях. Показано, что в аэробных условиях доминируют бактерии с размерами 0,23; 0,38 мкм, а в анаэробных условиях дополнительно обнаруживаются бактерии размером 0,17 мкм. Сделано предположение о том, что в анаэробных условиях рост бактерий происходит за счет увеличения численности мелких форм бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

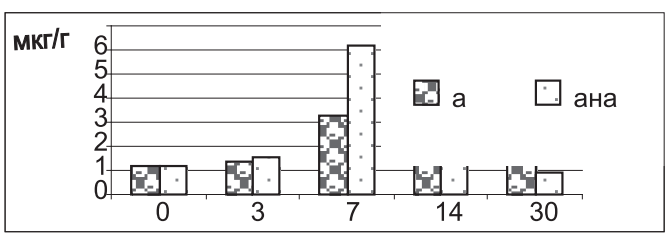
1. *Folk R.L.*, *Lynch F.L.* The possible role of nannobacteria (dwarf bacteria) in clay-mineral diagenesis and the importance of careful sample preparation in high-magnification SEM study // J. Sed. Res. – 1997. – V. 67. – P. 583–589.

2. *Himmelreich R.*, *Hilbert H.*, *Plagens H.* Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* II // Nucl. Acids Res. – 1996. – V. 24. – P. 4420– 4449.

3. *Mushegian A.R.*, *Fullner K.J.*, *Koonin E.V.*, *Nester E.W.* A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – V. 93. – P. 7321–7326.

4. *Maniloff J.* Nannobacteria: size limits and evidence (Letter) // Science. – 1997. – V. 276. – P. 1776–1777.

5. *Volke F.* Nannobacteria: size limits and evidence // Natural Science. – 1997. – V. 1. [http://naturalscience.com/ns/letters/ns_let02.html].



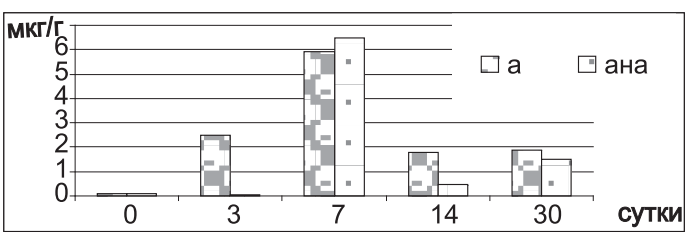


Рисунок. Общая биомасса бактерий в верхнем слое гор. А и нижнем слое гор. В при аэробных и анаэробных условиях.

Gorbacheva M.A., Polyanskaya L.M.

DISTRIBUTION OF BACTERIA BY THEIR SIZE IN AEROBIC AND ANAEROBIC CONDITIONS IN CHERNOZEM DURING MICROBIAL SUCCESSION

Moscow State University, Moscow, Russia, lpolyanskaya@mail.ru

Summary. Distribution of bacteria by their size during microbial succession in different layers and horizons of chernozem in aerobic and anaerobic conditions is studied. It is shown that under aerobic conditions, bacteria over 0.23 and 0.38 microns dominate; while under anaerobic conditions to them join also bacterial cells of 0.17 microns are also present. Thus, under anaerobic conditions, the bacterial growth was due to the increase in number of fine forms of bacteria.

Key words: bacteria, size, aerobic and anaerobic conditions, microbial succession.

УДК 579.8.06

Капаруллина Е.Н.[1,2], Порошина М.Н.[1,2], Доронина Н.В.[1,2], Ковалевская Н.П.[3]

НОВЫЕ ШТАММЫ АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ БИОТОПОВ СОЛИКАМСКА

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К.Скрябина РАН, г. Пущино, Россия, lenokap@rambler.ru; [2]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пущинский государственный университет”, г. Пущино, Россия; [3]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия

Резюме. Из засолённых техногенных биотопов Соликамска выделены 3 штамма галотолерантных /галофильных аэробных метилотрофных бактерий. Штаммы SK2395B и LS при росте на метаноле реализуют рибулозомонофосфатный путь C_1-метаболизма, тогда как штамм SK3270 – рибулозобисфосфатный путь. На основании секвенирования генов 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизации штаммы идентифицированы до вида: *Arthrobacter protophormiae* SK 2395B, *Methylophaga thalassica* LS и *Ancylobacter rudongensis* SK3270. Установлено, что в качестве основного осмопротектора умеренно галофильный штамм *M. thalassica* LS синтезирует циклическую иминокислоту эктоин.

Ключевые слова: метилобактерии, филогения, пути C_1-метаболизма, эктоин.

Введение

Аэробные галофильные и алкалофильные метилобактерии, использующие окисленные или замещённые производные метана в качестве источников углерода и энергии, являются участниками глобального цикла углерода в соленых и щелочных биотопах [1]. Первыми среди умеренно галофильных метилобактерии, оптимально растущих при 3% NaCl, оказались представители родов *Methylophaga* и *Methylarcula* [1]. Цель настоящей работы – исследование аэробных метилотрофных бактерий из засоленных биотопов Соликамска.

Результаты и обсуждение

Из образцов почвы и ила техногенных биотопов г. Соликамска на среде “К” [1] с 0,5% метанола и 3% NaCl выделены 3 новых штамма метилобактерий. Штамм LS, выделенный из ила Людмилинской соляной скважины, является умеренно галофильной облигатной метилобактерией, поскольку растет в среде, содержащей до 15% NaCl, но оптимально при 3-5% NaCl, и не использует полиуглеродные соединения в качестве источников углерода и энергии. Штаммы SK2395B и SK3270, выделенные из почв отвалов Соликамских калийных рудоуправлений, являются галотолерантными факультативными метилобактериями, поскольку наряду с метанолом и метилированными аминами используют органические кислоты и углеводы и растут без соли, хотя устойчивы к 16% NaCl в среде. Показано, что штаммы LS и SK2395B имеют дегидрогеназы метанола, формальдегида, формиата и гексулозофосфатсинтазу и реализуют рибулозомонофосфатный путь C_1-метаболизма, тогда как штамм SK3270 обладает рибулозо-1.5-бисфосфаткарбоксилазой и, следовательно, реализует рибулозобисфосфатный путь ассимиляции углерода.

Секвенирование генов 16S рРНК выявило принадлежность новых метилобактерий к трем различным родам классов *Alpha-*, *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria*. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм LS имеет высокую гомологию (99,0-99,8%) с представителями рода *Methylophaga* и наибольшее сходство 99,8% с *Methylophaga thalassica* DSM 5690^T (X95460), а уровень их сходства по ДНК-ДНК гибридизации в 100%, позволяет говорить о принадлежности штамма LS к этому виду (см. рисунок).

Штамм SK2395B на основании секвенирования гена 16S рРНК отнесен к классу *Actinobacteria* и имеет 100% гомологию с *Arthrobacter protophormiae* DSM 20168^T (X80745). Штамм SK3270 имеет наибольшую гомологию последовательностей генов 16S рРНК с представителями рода *Ancylobacter*: 99,4% с *A. aquaticus* и 99,8% – с *A. rudongensis* AS1.1761^T. Проведенная ДНК-ДНК гибридизация выявила высокий процент сходства штамма SK 3270 с *A. rudongensis* AS1.1761^T (78%), что свидетельствует о его принадлежности к данному виду.

Известно, что с увеличением солености среды микроорганизмы реализуют несколько стратегий регуляции осмотического равновесия, либо накапливая неорганические ионы в цитоплазме, либо синтезируя совместимые растворимые вещества – осмопротекторы. Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и тонкослойной хроматографии показано, что основным осмопротектором у умеренно галофильного штамма *M. thalassica* LS является циклическая иминокислота эктоин, синтезируемая *de novo* клетками при повышении концентрации NaCl в среде.

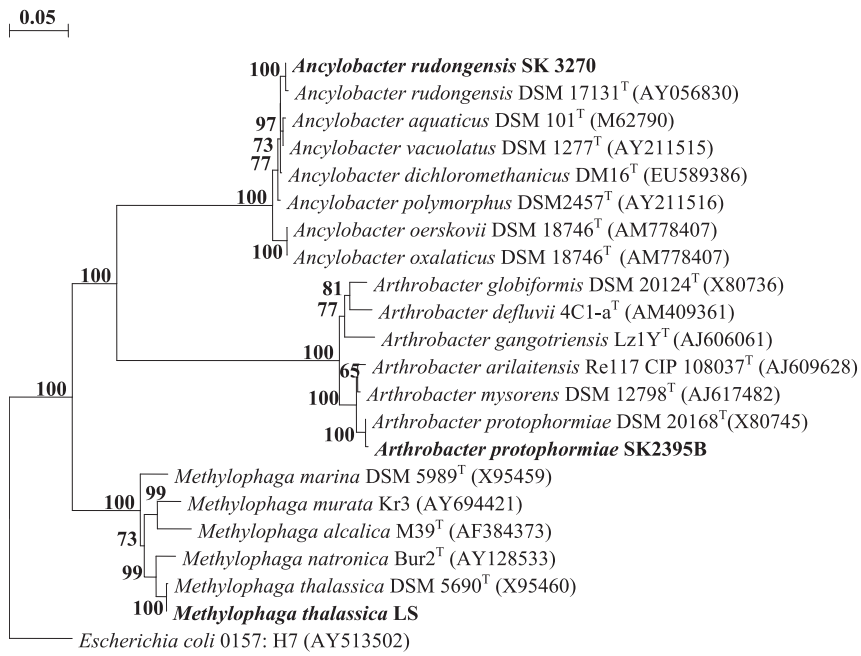


Рисунок. Филогенетическое положение новых штаммов *A. protophormiae* SK2395B, *A. rudongensis* SK 3270 и *M. thalassica* LS, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей 16S рДНК. Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционным расстоянием). Корень определен включением последовательности *E. coli* в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Выводы

Полученные данные расширяют представление о биоразнообразии галотолерантных/галофильных метилобактерий из засолённых техногенных биотопов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л.* Аэробные метилобактерии.– Пущино.: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. – 325 с.

Kaparullina E.N.[1,2], Poroshina M.N.[1,2], Doronina N.V.[1,2], Kovalevskaya N.P.[3]

NEW STRAINS OF AEROBIC METHYLOTROPHIC BACTERIA FROM SOLIKAMSK BIOTOPES

[1]G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia, lenokap@rambler.ru; [2]Pushchino State University, Pushchino, Russia; [3]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

Summary. Three strains of halotolerant/halophilic aerobic methylotrophic bacteria were isolated from man-made saline biotopes of Solikamsk. During growth on methanol the strains SK 2395B and LS were shown to operate the ribulose monophosphate pathway of C_1-metabolism, unlike the SK 3270 strain utilizing the Calvin-cycle for carbon assimilation. Based on 16S rRNA gene sequencing and DNA-DNA hybridization, the new isolates were classified as *Arthrobacter protophormiae* SK2395B, *Methylophaga thalassica* LS and *Ancylobacter rudongensis* SK3270. It was determined that the major osmoprotectant synthesized by a moderately halophilic strain *M. thalassica* LS was a cyclic imino acid ectoine.

Key words: methylotrophic bacteria, phylogeny, C_1-metabolism, ectoine.

УДК 579.862.1–579.864.1+637.1

Карташев А., Бурец Е., Коев Г., Богдан Н.

ШТАММЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ПЕРСПЕКТИВНЫМИ ДЛЯ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Научно-практический институт садоводства, виноградарства и пищевых технологий, Кишинев, Республика Молдова, tolik-leto1984@mail.ru

Резюме. Создана и постоянно пополняется Отраслевая Коллекция местных штаммов молочнокислых бактерий в лаборатории пищевой биотехнологии НПИСВПТ РМ. Штаммы, выделенные из местных самоквасных кисломолочных продуктов, обладают ценными технологическими свойствами. Культуры предназначены для использования в качестве стартовых культур при производстве кисломолочных продуктов.

Ключевые слова: местные штаммы молочнокислых бактерий, Отраслевая коллекция, технологические характеристики.

Введение

Молочнокислые бактерии являются одной из наиболее важных и близких человеку групп микроорганизмов. Результат применения молочнокислых бактерий напрямую зависит от свойств того или иного штамма. Поэтому чрезвычайно важен научный поиск высокоактивных штаммов с оптимальными показателями физиолого-биохимических и технологических свойств. Для Республики Молдова исследования такого характера весьма актуальны, ибо промышленные культуры молочнокислых бактерий являются предметом импорта, дорогостоящие и не всегда дают ожидаемый эффект в условиях местного молочного сырья. В связи с этим в лаборатории пищевых биотехнологий НПИСПТ проводятся исследовательские работы по созданию Отраслевой коллекции местных штаммов молочнокислых бактерий с биотехнологически значимыми свойствами, предназначенных для использования в композиции стартовых культур при производстве кисломолочных продуктов.

Известно, что в натуральной среде обитания молочнокислых бактерий – самоквасных кисломолочных продуктах происходит естественная селекция штаммов с высоко выраженной биохимической активностью. Считается, что местные молочнокислые бактерии наиболее приспособлены к росту в сырье именно данного региона, а также к взаимовыгодному симбиозу в желудочно-кишечном тракте местного населения [1]. Исходя из этого, для исследований мы выделяли штаммы из местной самоквасной молочной продукции крестьянских хозяйств. В настоящее время в Отраслевой коллекции хранятся около 60 местных штаммов молочнокислых бактерий – представителей видов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, обладающих перспективными биотехнологическими свойствами для использования в композиции стартовых культур.

Результаты и обсуждение

Основные технологические характеристики штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в Отраслевой коллекции НПИСПТ представлены в табл. 1 и 2.

Приведенные характеристики свидетельствуют о том, что по технологическим свойствам коллекционные штаммы молочнокислых бактерий соответствуют промышленным требованиям.

В Отраслевой коллекции культуры хранятся в лиофилизированном состоянии, что обеспечивает эффективную и длительную сохранность жизнеспособности культур. Процесс лиофилизации производится на современной установке Labconco Freeze-Dry Systems. Культивирование штаммов осуществляется в биореакторе BIOSTAT®A plus-Sartorius с программным обеспечением процесса ферментации.

Таблица 1.

Характеристики штаммов мезофильных молочнокислых бактерий

Технологические показатели (в молоке с 3-5 % культуры, при 30°С)	*L. lactis* ssp. *lactis*	*L. lactis* ssp. *cremoris*	*L. lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis
Образование сгустка	6,5-7,5 час	7,0-9,0 час	9,0-11,0 час
Консистенция сгустка	Однородная, плотная	Однородная, плотная, у некоторых вязкая	Однородная, умеренно плотная
Вкус и запах сгустка	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный с ароматом
Титруемая кислотность	76-90 °Т	75-81 °Т	78-85 °Т
Образование ароматических веществ	–	–	15-20 мин, по щелочной пробе
Микроскопический препарат	Диплококки одиночные и в цепочках по 4-6	Диплококки одиночные и в цепочках по 4-12	Диплококки одиночные и в цепочках по 4-6

Таблица 2.

Характеристики штаммов термофильных молочнокислых бактерий

Технологические показатели (в молоке с 4-5% культуры, при 40°С)	*Streptococcus thermophilus*	*Lactobacillus bulgaricus*
Образование сгустка	4,5-5,0 час	4,0-5,0 час
Консистенция сгустка	Однородная, плотная, у некоторых вязкая	Однородная, плотная, у некоторых вязкая
Вкус и запах сгустка	Чистый, кисломолочный	Чистый, кисломолочный, у некоторых щиплющий
Титруемая кислотность	70-88°Т	90-99°Т
Микроскопический препарат	Диплококки одиночные и в длинных цепочках	Палочки одиночные и в цепочках

При периодических проверках коллекционных культур установлено, что не все штаммы молочнокислых бактерий при хранении сохраняют первоначальную биотехнологическую активность. Наиболее устойчивыми с технологической точки зрения являются представители *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Культуры коллекционных штаммов молочнокислых бактерий используются нами при разработках технологий производства стартовых культур и кисломолочных продуктов. На их основе были созданы многокомпонентные устойчивые комбинации и разработаны стартовые культуры для сметаны, простокваши, творога, сыров, ряженки и йогурта.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности выделения из спонтанной микрофлоры местной самоквасной молочной продукции штаммов молочнокислых бактерий с натуральным биопотенциалом. Характеристики данных штаммов демонстрируют перспективность их использования в композиции стартовых культур для производства молочнокислых продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ганина В.И., Ананьева Н.В., Рожкова Г.В.* Интегрированный подход к созданию отечественных стартовых культур прямого внесения. // Молочная промышленность. – 2005. – № 11. – С. 23–24.

Kartashev A., Burets E., Koev G., Bogdan N.

LACTIC ACID BACTERIA STRAINS WITH PERSPECTIVE BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES FOR THE DAIRY INDUSTRY

Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technology, Republic of Moldova, Kishinev, icsptia@mail.ru

Summary. The Branch Collection of local lactic acid bacteria strains was created and is being constantly replenished at the Laboratory of Food Biotechnology, Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technology, Republic of Moldova. Strains with valuable processing characteristics were isolated from regional dairy products of spontaneous fermentation. The cultures could be used as starters to produce different dairy products.

Key words: local strains of lactic acid bacteria, the Branch Collection, processing characteristics.

УДК 57.065+582.231+631.472.74+58.051

Корсакова Е.С., Ананьина Л.Н., Назаров А.В., Плотникова Е.Г.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕХНОГЕННОЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВАХ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, Camomille-08@mail.ru, peg@iegm.ru

Резюме. В ризосфере растений, произрастающих в районе промышленных солеразработок (г. Соликамск, Пермский край), выявлено большое разнообразие бактерий различных филогенетических групп. Значительный массив грамотрицательных прокариот представлен галофильными бактериями семейства *Halomonadaceae* (роды *Kushneria*, *Halomonas*, *Salinicola*), а также галотолерантными бактериями классов *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Flavobacteria*. В образцах выявлены спорообразующие бактерии (порядок *Bacillales*) и актинобактерии порядка *Actinomycetales*.

Ключевые слова: засоленные почвы, ризосфера, филогенетическое разнообразие, ген 16S рРНК.

Введение

В последние десятилетия вследствие возросшей антропогенной деятельности человека наблюдается увеличение техногенных территорий с засоленными почвами и, как следствие, измененными условиями обитаниями ризосферной микрофлоры. Влияние засоления оказывает избирательную роль на всю совокупность бактерий ризосферы. Видовое микробное разнообразие техногеннозасоленных почв исследовано недостаточно, еще меньше данных о видовом составе бактерий, живущих в ассоциации с растениями.

Материалы и методы исследования

С территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ОАО "Уралкалий", г. Соликамск, Пермский край) в районе солеотвалов было отобрано 11 образцов ризосферы растений: Ястребинка зонтичная (*Hieracium umbellatum* L.) – 1 образец, Торичник солончаковый (*Spergularia salina* J. & C.) – 1 образец, Мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) – 5 образцов, Марь красная (*Chenopodium rubrum* L.) – 3 образца, Мать-и-мачеха обыкновенная (*Tussilago farfara* L.) – 1 образец. Выделение штаммов бактерий производили методом прямого высева на агаризованную полноценную среду Раймонда с содержанием различных концентраций NaCl (5%, 6%, 15%). Штаммы для дальнейшего исследования отбирали на основании морфологических характеристик выросших на агаризованной среде колоний. Филогенетический анализ полученных изолятов был основан на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL ("Applied Biosystems", США). Полученные нуклеотидные последовательности длиной около 800 пн были проанализированы с использованием программ CLUSTAL W, Sequence Scanner v1.0. Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) и EzTaxon (http://www.eztaxon.org).

Таблица.

Филогенетический анализ выделенных ризосферных бактерий

Растение	Штамм	Сходство,%	Типовой штамм
Ястребинка зонтичная	M16-1	99,37	*Pseudomonas brenneri* CFML 97-391^T
	M17-1	99,75	*Brevibacterium casei* NCDO 2048^T
Торичник солончаковый	M35-11N	99,6	*Isoptericola halotolerans* YIM 70177^T
	M35-15N	99,16	*Pseudomonas seleniipraecipitatus* CA5^T
Мятлик луговой	M45-1N	99,70	*Kocuria polaris* CMS 76оп^T
	M45-2N	99,75	*Halomonas ventosae* Al12^T
	M45-6N	99,87	*Zhihengliuella halotolerans* YIM 70185^T
	M46-7	96,12	*Alteromonas hispanica* F-32^T
	M46-11	99,10	*Isoptericola halotolerans* YIM 70177^T
	M47-1	99,14	*Kushneria marisflavi* SW32^T
	M47-2	98,02	*Microbacterium binotii* CIP 101303^T
	MH46-2	98,96	*Halomonas boliviensis* LC1^T
	M55-1N	100,00	*Streptomyces griseoplanus* AS 4.1868^T
	M55-5N	100,00	*Nesterenkonia halotolerans* YIM 70084^T
	M55-6N	99,86	*Micrococcus endophyticus* YIM 56238^T
	M56-8	97,30	*Leeuwenhoekiella aequorea* LMG22550^T
	M65-1N	98,00	*Rhizobium vignae* CCBAU 0517^T
	M65-2N	99,28	*Altererythrobacter indicus* MSSRF26^T
	M65-3N	98,57	*Thalassospira xianhensis* P-4^T
	M65-4N	98,10	*Rhizobium sphaerophysae* CCNWGS0238^T
	M65-5N	99,00	*Pseudomonas xanthomarina* KMM1447^T
	M75-1	98,69	*Bacillus aquimaris* TF-12^T
	M75-3N	99,88	*Bacillus thioparans* BMP-1^T
	M95-1N	99,77	*Planomicrobium koreense* JG07^T
	M95-3N	99,00	*Paracoccus homiensis* DD-R11^T
	MH96-1	98,96	*Halobacillus profundi* IS-Hb4^T
Марь красная	M105-1	99,65	*Salinicola salarius* M27^T
	M106-5	99,18	*Kushneria marisflavi* SW32^T
	M107-2	100,00	*Microbacterium phyllosphaerae* DSM13468^T
	M107-4	99,88	*Bacillus safensis* FO-036b^T
	M115-1	99,70	*Bacillus hwajinpoensis* SW-72^T
	M115-4N-b	99,13	*Halomonas titanicae* BH1^T
	M116-2	98,90	*Microbacterium fluvii* YSL3-15^T
	M116-3	99,40	*Halomonas taeanensis* BH539^T
	M116-4	99,05	*Planomicrobium flavidum* ISL-41^T
	M116-7	99,10	*Salegentibacter salarius* ISL-6^T
	M116-8	97,58	*Marinobacter maritimus* CK47^T
	M136-2	98,57	*Isoptericola chiayiensis* 06182M-1^T
	M136-3	99,23	*Isoptericola halotolerans* YIM 70177^T
	M136-7	99,76	*Salinibacterium amurskyense* KMM 3673^T
Мать-и-мачеха обыкновенная	M125-1	99,30	*Halomonas boliviensis* LC1^T
	M126-4	100,00	*Janibacter hoylei* DSM 21601^T
	M127-7	100,00	*Micrococcus yunnanensis* YIM 65004^T

Результаты и обсуждение

В исследованных образцах ризосферы было обнаружено и идентифицировано 43 бактериальных штамма (см. таблица). Наибольшее видовое разнообразие бактерий наблюдалось в образцах ризосферы Мятлика лугового, являющегося доминирующим видом в изучаемом районе. В образцах выявлены спорообразующие бактерии порядка *Bacillales* (роды *Bacillus*, *Halobacillus*, *Planomicrobium*) и актинобактерии порядка *Actinomycetales* 8 родов (*Isoptericola*, *Zhihengliuella*, *Nesterenkonia*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Janibacter*), которые, как известно, устойчивы к экстремальным условиям существования. Исходный высокий уровень минерализации среды (суммарная концентрация Na^+ и K^+ составляла от 112 до 2473 мг/кг почвы) обусловливает наличие не только галотолерантных, но и галофильных бактерий, представителей семейства *Halomonadaceae* (роды *Kushneria*, *Halomonas*, *Salinicola*).

В настоящее время современные микробиологические и молекулярно-генетические методы позволяют выявить и охарактеризовать большое разнообразие еще малоизученной группы ризосферных микроорганизмов из засоленных местообитаний. В настоящей работе получены данные по филогенетическому разнообразию культивируемых бактерий ризосферы наиболее часто встречаемых растений из района солеразработок Верхнекамского месторождения солей (г. Соликамск, Пермский край).

Работа поддержана "FP7 Cooperation Work Programme: Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnologies", Proposal No 266106 "BRIO".

Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Nazarov A.V., Plotnikova E.G.

PHYLOGENETIC DIVERSITY OF BACTERIA FROM THE RHIZOSPHERE OF PLANTS GROWING ON TECHNOGENICALLY MINERALIZED SOILS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, Camomille-08@mail.ru, peg@iegm.ru

Summary. In the rhizosphere of plants growing at the industrial salt-mining sites (Solikamsk, Perm region), a wide range of bacteria of different phylogenetic groups has been revealed. Considerable number of gram-negative prokaryotes was represented by halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae* (genera *Kushneria*, *Halomonas*, *Salinicola*), and halotolerant bacteria of classes *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Flavobacteria*. Spore-forming bacteria (order *Bacillales*) and actinobacteria of the order *Actinomycetales* were observed in the analyzed samples.

Key words: saline soils, rhizosphere, phylogenetic diversity, 16S rRNA gene.

УДК 633.11. 321+632.3

Кутлубердина Д.Р., Хайруллин Р.М.

НОВЫЕ ПУТИ СНИЖЕНИЯ ВРЕДОНОСНОСТИ ФУЗАРИОЗА КОЛОСА

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, di2412@yandex.ru

Резюме. В работе рассматриваются современные пути снижения вредоносности фузариоза колоса зерновых культур. Помимо наиболее распространенных и общепризнанных (применение фунгицидов различной природы) методов борьбы с этим заболеванием, авторы обращают внимание на перспективность изучения биодеградации токсинов фузариевых и других грибов ферментами различных микроорганизмов.

Ключевые слова: фузариоз, фузариевые грибы, фунгицид, эндофит, фузариотоксины.

Среди фитопатогенов, вызывающих болезни культурных растений, порой переходящие в эпифитотии, особо выделяются грибы рода *Fusarium*. Космополитизм и растительная "всеядность", возможность длительного существования в сапрофитной фазе, прогрессирующая устойчивость к применяемым фунгицидам позволяют грибам этого рода постоянно расширять свои экологические ниши. Фузариоз колоса зерновых культур в настоящее время является вредоноснейшей болезнью, которая опасна не только снижением урожайности зерна и качества семян, но и накоплением в них ряда микотоксинов. Обилие публикаций о поражении злаков фузариозом колоса в странах Западной Европы, Америке и Азии свидетельствует о широком распространении этой болезни, которой заражаются практически все районированные сорта всех злаковых культур.

Известно, что одним из существенных факторов, влияющим на зараженность зерна грибами рода *Fusarium*, является генетическая особенность сорта [1]. В связи с этим перспективным и экологически безопасным методом защиты растений от болезней считается создание устойчивых сортов. И.Б. Абловой с соавт. [2] предложена модель сортов, позволяющих свести до минимума ущерб от фузариоза колоса. Эти авторы разработали и обосновали новую модель устойчивого сорта для Краснодарского края. Однако количество высокоустойчивых сортов невелико, причем эти сорта не отличаются высокой урожайностью или слабо приспособлены к определенным климатическим условиям. С развитием методов молекулярной биологии возрастают возможности генетической трансформации растений. В качестве потенциальных генов-кандидатов для переноса в растения с целью повышения их устойчивости к фузариозу рассматриваются последовательности ДНК, кодирующие синтез защитных белков или ферментов, разрушающих фузариотоксины.

Вторым известным и общепризнанным способом снижения распространения фузариоза колоса является применение фунгицидов различной природы. Удачно подобранный фунгицид при оптимальных сроках и нормах применения может хорошо подавлять развитие токсиногенных видов *Fusarium*, и, соответственно, снижать контаминацию зерна фузариотоксинами. В исследованиях, проведенных нами ранее [3], также показана эффективность применения фунгицидов для борьбы с фузариозом колоса яровой пшеницы. Однако часто, когда болезнь колоса вызывается комплексом фузариевых грибов, отличающихся чувствительностью к одному и тому же фунгициду, защитное действие которого зависит также и от факторов окружающей среды (температура, влажность) и фазы развития растений, эффект фунгицидной обработки не отличается постоянством. Известно, что биологическая эффективность лучших фунгицидов не превышает 60-70%, при этом не всегда отмечается снижение содержания токсинов в зерне. В настоящее время многие исследователи отмечают возможность использования бактерий рода *Bacillus*, в частности, *B. subtilis* для контроля численности фитопатогенных грибов, в том числе рода *Fusarium*, и, тем самым, защиты растений от фузариоза. Виды *Bacillus* имеют ряд преимуществ благодаря их способности образовывать эндоспоры и синтезировать антибиотики с широким спектром активности. Ранее нами был проведен скрининг 23 штаммов *B. subtilis* и показано, что все они проявляли фунгистатичность к наиболее распространенным видам фузариевых грибов [4]. Таким образом, биоконтроль фузариоза может считаться еще одним из безопасных методов защиты растений от этого заболевания.

В последнее время многие исследователи предлагают использовать ферменты различных микроорганизмов в качестве деструкторов токсинов грибов, в том числе и *Fusarium*. Деструкция микотоксинов может наблюдаться в результате действия ферментов, обладающих оксидоредуктазной, или гидролитической, или трансферазной активностью. Такие ферменты способны продуцировать микроорганизмы, находящиеся, например, в кишечнике животных. Так, исследуя действие кишечной микрофлоры на фузариотоксины, удалось выделить бактерии, принадлежащие к родам *Bacillus*, *Curtobacterium* и *Staphylococcus*, которые трансформировали Т-2 токсин до нетоксичных производных. Почвенные микромицеты также могут трансформировать трихотецены, причем сами представители рода *Fusarium* способны к модификации дезоксиниваленола путем ацетилирования и деацетилирования. Изучение биодеградации токсинов фузариевых и других грибов ферментами различных микроорганизмов является одним из новых направлений в биохимии и биотехнологии, что подтверждается пока небольшим количеством публикаций по этой проблеме. Интерес ученых к этой проблеме возрастает, и мы планируем направить свои исследования в данное русло работ.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ № 11-04-97044-р_поволжье_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кутлубердина Д.Р., Хайруллин Р.М.* Видовой состав и зараженность разных фракций зерна пшеницы грибами рода *Fusarium* в южной лесостепи Республики Башкортостан // Вестник КГУ. – 2009. – № 1. – С. 24–29.
2. *Аблова И.Б.* Принципы и методы создания сортов пшеницы, устойчивых к болезням (на примере фузариоза колоса) и их роль в становлении агроэкосистем: автореф. дис. ... доктора с.-х. наук: 06.01.05. – Краснодар, 2008. – 49 с.
3. *Кутлубердина Д.Р., Хайруллин Р.М.* Испытание эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 11 РН против фузариоза колоса яровой пшеницы // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 2. – С. 58–64.
4. *Кутлубердина Д.Р., Хайруллин Р.М., Егоршина А.А.* Антагонистические взаимоотношения эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* с грибами рода *Fusarium* // Матер. IV межрег. конф. молодых ученых "Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой", Саратов. – 2008. – С. 16.

Kutluberdina D.R., Khairullin R.M.

NOVEL PATHWAYS FOR *FUSARIUM* HEAD BLIGHT INJURIOUSNESS REDUCTION

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Centre, RAS, Ufa, Russia, di2412@yandex.ru

Summary. Novel approaches are discussed which allow reducing the harmful effect of *Fusarium* head blight of cereal crops. Together with the widespread and common methods (application of fungicides) for disease control, the authors consider it perspective to study the toxin biodegradation of *Fusarium* and other fungi using enzymes of various microorganisms.

Key words: *Fusarium* head blight, *Fusarium* fungi, fungicide, endophyte, *Fusarium* toxins.

УДК 504.062+631.466

Николаева Т.Г.[1], Сунгатуллина Л.М.[1], Рябичко С.С.[2]

СТРУКТУРА СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ АГРОЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ ЛАНДШАФТНО-ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ЗЕМЛЕДЕЛИЯ НА СЕВЕРЕ ЛЕСОСТЕПИ ПРИВОЛЖСКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ

[1]Институт проблем экологии и недропользования АН РТ, г. Казань, Россия, nikolaeva_tg@mail.ru, sunlyc@yandex.ru;

[2]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет", г. Казань, Россия, anomalhead@mail.ru

Резюме. Исследован таксономический состав и биомасса сообществ микромицетов почв различных агроценозов в условиях адаптивной эколого-ландшафтной системы земледелия в лесостепной провинции северной части Приволжской возвышенности. Определены показатели видового разнообразия, степени доминирования, выравненности и сходства сообществ микромицетов. Отмечено, что природоохранные, почвозащитные и рациональные агротехнические мероприятия положительно сказываются на видовом богатстве сообществ почвенных микромицетов.

Ключевые слова: ландшафтно-экологическое земледелие, почвенные микромицеты, структура сообщества, биоразнообразие.

Введение

Одним из основных компонентов почвенного биогеоценоза являются микроскопические грибы. Микромицеты чувствительны к изменению свойств почвы и могут служить индикатором ее состояния. Являясь редуцентами экосистем, они выполняют огромную роль в преобразовании органического вещества почв, поэтому без детальных исследований микросообществ невозможно решение проблем рационального природопользования, повышения плодородия почв и продуктивности сельскохозяйственных культур [1]. Нами изучена структура сообществ почвенных микромицетов агроэкосистем в условиях многолетней (более 45 лет) беспестицидной, адаптивной эколого-ландшафтной системы земледелия с широким внедрением почвозащитных, противоэрозионных мероприятий, приемов биологизации, традиционной системы земледелия (с применением пестицидов, минеральных удобрений, без оптимизации структуры агроландшафта) и 3 целинных участков.

Материалы и методы исследования

Отбор проб осуществляли в раннелетний период 2010 г. Почвенный покров изученных территорий был представлен темно-серыми тяжелосуглинистыми лесными почвами. Участки при АЭЛСЗ отличались более высоким содержанием органического углерода ($C_{орг}$), обменного калия ($K_{подв}$) (t_{St}=5,29, p=0,002) и значением обменной кислотности (pH_{KCl}) (t_{St}=3,37, p=0,01) по сравнению с полями при традиционном земледелии, для которых отмечены более высокие значения подвижного фосфора ($P_{подв}$) (t_{St}=4,81, p=0,003) (табл. 1). Содержание $C_{орг}$ (t_{St}=4,58, p=0,006) и $K_{подв}$ (t_{St}=4,21, p=0,02) достоверно выше на целинных участках, чем на полях при традиционном земледелии, характеризующихся более высокими значениями $P_{подв}$ (t_{St}=3,78, p=0,02).

Таблица 1.

Агрохимическая характеристика исследуемых участков

Варианты	$C_{орг}$, % (по Тюрину)	$N_{вал}$, %	$P_{подв}$, мг/100 г (по Чирикову)	$K_{подв}$, мг/100 г (по Чирикову)	pH_{H2O}	pH_{KCl}
Адаптивная эколого-ландшафтная система земледелия (АЭЛСЗ)						
$КМЗ_{пар}$	5,1	0,33	21	26	6,75	6,04
$ОСЗ_{пар}$	4,3	0,25	26	30	6,98	6,34
Однол.+многол. травы (1 год)	3,4	0,21	29	33	7,18	6,66
Многол. травы (8год)	5,2	0,28	20	27	7,44	6,76
Целина	4,8	0,26	20	35	6,86	6,36
Традиционная система земледелия (ТСЗ)						
Зерновые	3,7	0,30	47	19	6,90	5,96
Бобовые	2,5	0,26	39	12	6,94	5,93

Примечание. $КМЗ_{пар}$ – чистый пар с контурно-мелиоративной организацией территории поля, $ОСЗ_{пар}$ – чистый пар с обычной системой земледелия.

Учет микромицетов проводили с использованием твёрдых агаризованных питательных сред (среда Чапека, полусинтетическая среда КГА, голодный агар и почвенный агар) [2]. Идентификацию микромицетов до вида выполняли по М.А. Литвинову [3]. Для характеристики структуры комплексов микромицетов использовали показатель пространственной частоты встречаемости вида (ЧВ). Биомассу грибов определяли с помощью метода люминесцентной микроскопии путем пересчета по длине и диаметру мицелия грибов [2, 4].

Результаты и обсуждение

Из исследованных образцов почв при АЭЛСЗ выделено 34 штамма микроорганизмов, принадлежащих к 20 родам (*Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gliocladium*, *Monascus*, *Monilinia*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Stemphylium*, *Trichoderma*, *Verticillium*), 14 семействам, 11 порядкам, 5 классам и 2 отделам (*Ascomycota*, *Zygomycota*), и один стерильный мицелий. Наиболее разнообразны представители отдела *Ascomycota* (32 вида, 17 родов), особенно рода *Aspergillus* (6 видов), *Penicillium* (5) и *Trichoderma* (3). Среди выявленных микромицетов к эврибионтным отнесены: *Aspergillus fumigatus*,

Penicillium cyclopium, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium* sp., *Acremonium* sp., входящие в группу типично редких (ЧВ от 10% до 30%) и типично частых (ЧВ от 30 до 60%). Преимущественно типично редкие виды, отмеченные всего на двух участках, такие как *Aspergillus candidus*, *Penicillium funiculosum*, *Monascus* sp., *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Scopulariopsis* sp., *Absidia* sp., являются более стенобионтными. В целом, большая часть микромицетов, составляющих основу сообщества, относится к группе типично редких и типично частых. Наибольшей оригинальностью видового богатства (17%) характеризуется поле с контурно-мелиоративной системой земледелия. Представители *Aspergillus versicolor*, *A. terreus*, *Stemphylium* sp., *Stachybotrys* sp. и *Chaetomium* sp. встречены только на данном участке.

По видовому богатству выделяются также целинные участки, на которых в целом обнаружено 29 видов микромицетов, наименее разнообразны сообщества микромицетов почв при традиционном земледелии (24 вида). Среди модельных участков наибольшее число видов (S) отмечено на варианте с кормовой травосмесью 1 года пользования из однолетних злаково-бобовых и многолетних трав (люцерна) (21 вид). Известно, что чередование культур увеличивает разнообразие микромицетов в ризосфере и является важным агробиологическим мероприятием в борьбе с микромицетами-возбудителями корневых гнилей и почвоутомительными процессами. Высокие значения индекса видового богатства Маргалефа (D_{Mg}), индекса разнообразия Шеннона (H) и "индекса полидоминантности" (1/D) зафиксированы для сообществ микромицетов агроэкосистем при АЭЛСЗ (кроме многолетних трав) и целинных участков (табл. 2). Особенно выделяется комплекс микромицетов поля $КМЗ_{пар}$, характеризующийся максимальным разнообразием, выравненностью (e – индекс Пиелу) и полидоминантной структурой сообщества, что подтверждено показателями меры доминирования (1/D и 1/d – индекс Бергера-Паркера). Оптимизация структуры агроландшафта, внедрение противоэрозионных и почвозащитных мероприятий благотворно сказываются на почвенной экосистеме. Кроме того, пар способствует улучшению фитосанитарных условий, а также сбалансированности водного и питательного режимов почв [5]. Сообщество микромицетов участка под многолетними травами (люцерна) является наименее разнообразным, выравненным и полидоминантным. Долговременное возделывание монокультуры приводит к возникновению узкоспециализированных штаммов грибов, накоплению патогенов и метаболитов почвенных микромицетов, что отрицательно отражается на видовом разнообразии комплекса микромицетов [6]. Сравнение видового состава показало, что на участке, занятом люцерной 8 года пользования значительно меньше представителей родов *Aspergillus* и *Penicillium* в отличие от участка под травосмесью однолетних и многолетних культур. Высокий (0,82) коэффициент сходства Серенсена свидетельствует о близости комплексов микромицетов целинных участков и почвы под многолетними травами. Отмечено, что на степень доминирования (1/d) ($r_{Пирсона}$= -0,82, $p<0,05$) и выравненности (e) ($r_{Пирсона}$= -0,77, $p<0,05$) видов в сообществе микромицетов статистически значимое влияние оказывает значение актуальной кислотности почв (pH_{H2O}).

Таблица 2.

Видовое разнообразие и биомасса почвенных микромицетов исследуемых участков

Варианты	B (мг/г)	S	H	D_{Mg}	e	1/D	1/d
Адаптивная эколого-ландшафтная система земледелия (АЭЛСЗ)							
$КМЗ_{пар}$	0,98	20	4,05	2,82	3,11	14,70	10,63
$ОС_{пар}$	2,12	20	4,02	3,09	3,09	13,51	6,71
Однол.+многол. травы (1 год)	1,74	21	4,04	3,03	3,05	13,88	7,81
Многол. травы (8год)	1,36	16	3,58	2,42	2,97	9,61	4,87
Целина	1,63	20	4,01	2,93	3,08	13,33	8,78
Традиционная система земледелия (ТСЗ)							
Зерновые	1,33	16	3,63	2,34	3,01	11,09	7,00
Бобовые	1,29	18	3,88	2,57	3,09	13,15	8,40

Установлено, что средняя биомасса грибов (B) достоверно выше (t_{St}=4,53, p=0,04) на целинных участках, чем на полях при традиционном земледелии. Выявлена статистически значимая сильная обратная корреляционная связь ($r_{Спирмена}$= -0,81, $p<0,05$) между биомассой микромицетов и содержанием общего азота ($N_{вал}$) в почвах исследуемых участков. Избыточное внесение азотных удобрений угнетает прирост грибной биомассы.

Выводы

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что адаптивная эколого-ландшафтная система земледелия с внедрением почвозащитных и рациональных агротехнических мероприятий способствует повышению видового богатства, полидоминантной структуре и выравненности сообществ почвенных микромицетов агроэкосистем.

Авторы искренне признательны д.б.н. Алимовой Ф.К. за содействие в проведении микробиологических исследований, м.н.с. Либельт А.В. за выполнение агрохимического анализа почвенных проб, к.б.н. Григорьяну Б.Р. за ценные советы и всестороннюю помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Хабибуллина Ф.М.* Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем Северо-Востока европейской части России: Автореф. дис. … докт. биол. наук. – Сыктывкар, 2009. – 40 с.

2. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.

3. *Литвинов М.А.* Определитель микроскопических почвенных грибов. – Л.: Наука, 1967. – 303 с.

4. *Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Звягинцев Д.Г.* Биомасса грибов в различных типах почв // Почвоведение. – 1995. – №5. – С. 566–572.

5. Земледелие / Под ред. С.А. Воробьева. – М.: Агропромиздат, 1991. – 527 с.

6. *Лугаускас А.Ю.* Микромицеты окультуренных почв Литовской ССР и их способность адаптироваться к разным субстратам (экологические и прикладные аспекты): Дис. … докт. биол. наук. – Вильнюс, 1984. – 577 с.

Nikolaeva T.G.[1], Sungatullina L.M.[1], Ryabichko S.S.[2]

THE STRUCTURE OF SOIL MICROMYCETE COMMUNITIES IN AGROECOSYSTEMS UNDER LANDSCAPE-ECOLOGICAL AGRICULTURE IN NORTHERN FOREST-STEPPE OF THE VOLGA UPLAND

[1]Institute for Problems of Ecology and Mineral Wealth Use of Tatarstan Academy of Sciences, Kazan, Russia, nikolaeva_tg@mail.ru, sunlyc@yandex.ru; [2]Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia, anomalhead@mail.ru

Summary. The taxonomic composition and biomass of soil micromycete communities from different agrocenosis under the adaptive ecological landscape agricultural system in the forest-steppe province of northern part of the Volga Upland were investigated. Parameters of species diversity, measure of dominance, uniformity and similarity of micromycete communities were determined. It was noted that environmental protection, soil protection and rational agrotechnical measures have a positive impact on the species diversity of soil micromycete communities.

Key words: landscape-ecological agriculture, soil micromycetes, community structure, biodiversity.

УДК 631.46:631.8

Парамонов А.Ю., Свистова И.Д.

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОМИЦЕТОВ В ПОЧВЕ ПОД ЛЕКАРСТВЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Воронежский государственный педагогический университет”, г. Воронеж, Россия, andrey-2008@freemail.ru

Резюме. Показано, что в регуляции системы почва – микробное сообщество – растения участвуют “метаболические” связи. Вторичные метаболиты растений семейства *Labiatae* обладают фунгицидным действием. Снижается видовое разнообразие комплекса типичных видов почвенных грибов. Накапливаются виды грибов, синтезирующие микотоксины широкого спектра действия. Они вносят важный вклад в развитие почвенного фитотоксикоза.

Ключевые слова: микромицеты, ризосфера, Губоцветные, метаболические взаимодействия.

Введение

Взаимоотношение растений и почвенной микрофлоры регулируется с помощью трофических и метаболических связей. В основе взаимодействия данной системы лежат трофические связи [1]. Микроорганизмы обеспечивают растения элементами минерального питания. В свою очередь растения выделяют в почву корневые экссудаты (сахара, органические и аминокислоты и т.д.) и ризодепозиты (отмирающие клетки корня), снабжая таким образом микрофлору ризосферы органическими веществами.

Метаболические связи исследованы значительно хуже. Крайне мало информации о влиянии вторичных метаболитов растений на микробное сообщество почвы. Наиболее выраженное влияние на микробное сообщество оказывают лекарственные растения семейства губоцветных. Состав ризодепозитов у растений разных семейств варьирует, что является определяющим в составе и структуре почвенного микробного сообщества. Синтезируя эфирные масла, гликозиды (тимол, ментол [2]), они могут нарушать состав комплекса микромицетов.

Цель работы – изучить видовое разнообразие микромицетов в почве под лекарственными растениями.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – комплекс микромицетов, почва – чернозём выщелоченный, варианты опыта: контроль (парующая почва), лекарственные растения представителей семейства *Labiatae* третьего года выращивания. Пробы почвы отбирали из слоя 0-20 см в фазу цветения растений, когда наблюдается максимум корневой экссудации. Исследовали почву под растениями: *Origanum vulgare* (душица обыкновенная), *Hyssopus officinalis* (иссоп лекарственный), *Salvia officinalis* (шалфей лекарственный), *Mentha piperita* (мята перечная), *Leonurus quinquelobatus* (пустырник пятилопастной), *Thymus serpillum* (тимьян ползучий или чабрец).

Численность грибов определяли на среде Чапека, видовой состав грибов выявляли по соответствующим определителям. Выделенные грибы сравнивали по морфологическим признакам с изолятами из чернозема выщелоченного. Фитотоксичность почвы определяли методом биотестов (тест-растение редис) по ингибированию роста корня проростка.

Результаты и обсуждение

Вторичные метаболиты губоцветных проявляли яркое фунгицидное действие. Численность микромицетов чернозема снижалась под растениями семейства *Labiatae* в 3-10 раз по сравнению с целиной (таблица). Количество токсигенных видов грибов под растениями семейства *Labiatae* несколько возрастало. Видовое разнообразие комплекса типичных видов почвенных грибов при этом сокращается, т.к. ряд видов из типичных переходят в разряд случайных, либо не выделяется. Это касается нетоксигенных видов грибов, их доля снижается в 45 раз до 15%.

Данные по плотности видов грибов подтверждают негативное влияние растений данного семейства на биоразнообразие комплекса почвенных микромицетов. Плотность типичных видов возрастает в 2 раза за счет элиминации многих редких и случайных видов грибов. Это явление называют “концентрацией доминирования”. Доля токсигенных видов микромицетов возрастала под разными растениями данного семейства в 5-9 раз.

Таблица.

Показатели структуры комплекса микромицетов и фитотоксические свойства чернозема под разными фитоценозами

Показатели	Разнотравно-злаковая ассоциация	Растения семейства губоцветные
Численность грибов, 10^3	17-30	3-12
Количество типичных видов	20-22	13-15
Из них токсигенных	9-10	11-13
Плотность типичных видов, %	43-47	87-94
Из них токсигенных, %	9-11	72-85
Фитотоксичность почвы, %	3-5	18-22

Одновременно отмечено возрастание фитотоксичности чернозема выщелоченного в 4-7 раз по сравнению с контролем. Следовательно, накопление токсигенных видов грибов вносит значительный вклад в возрастание почвенного фитотоксикоза под губоцветными.

Микромицеты, не выделяющиеся или резко снижающие частоту встречаемости в почве под растениями семейства *Labiatae*, мы объединили в группу *чувствительных* к действию вторичных метаболитов растений видов. Виды, частота встречаемости и плотность которых возрастала в ризосфере растений семейства *Labiatae*, объединили в группу *индикаторных* для ризосферы данных растений видов. К чувствительным видам микромицетов относятся *Paecilomyces lilacinum*, *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium simplicissimus*, *Rhizopus stolonifer.* К индикаторным видам относятся *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *Alternaria alternata*, *Talaromyces flavus*, *P. viridicatum*, *Penicillium funiculosum.*

Заключение

Таким образом, обнаружено, чтовторичные метаболиты лекарственных растений семейства *Labiatae* обладают фунгицидным действием, при этом снижается видовое разнообразие комплекса типичных видов почвенных грибов. Индикаторные для ризосферы данных растений виды грибов известны как продуценты. За счет этого они выигрывают конкурентную борьбу, подавляя другие почвенные микотоксины, а также вносят важный вклад в развитие почвенного фитотоксикоза. Таким образом, в ризосфере растений семейства *Labiatae* “метаболические связи” растений и почвенных грибов значительно усиливаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мирчинк Т.Г.* Почвенная микология. – М.: МГУ, 1988. – 220 с.
2. *Лукнер М.* Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. – М.: Мир, 1979. – 548 с.

Paramonov A.U., Svistova I.D.

DIVERSITY OF MICROMYCETES SPECIES IN SOIL UNDER MEDICINAL PLANTS

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia, andrey-2008@freemail.ru

Summary. It is shown that the regulation of soil – microbial community – plants involves “metabolic” communication. Secondary metabolites of plants of the family *Labiatae* have fungicidal activity reducing species diversity of typical soil fungi. Accumulating species of fungi are capable of synthesizing a wide range of mycotoxins. They are responsible for soil phytotoxicity.

Key words: micromycetes, rhizosphere, *Labiatae*, metabolic interactions.

УДК 579.8

Рыжманова Я.В., Вайнштейн М.Б., Щербакова В.А.

АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ СОДОВЫХ ОЗЕР ЮЖНОГО ЗАБАЙКАЛЬЯ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия, *yanki2@rambler.ru*

Резюме. Обитатели содовых озер относятся к облигатным алкалофилам и находятся под воздействием высокого pH и повышенного осмотического давления, обусловленного минерализацией воды. Целью данной работы было исследование анаэробных бактерий, выделенных из содовых озер в Южном Забайкалье, изучение их физиолого-биохимических свойств и определение таксономического положения. Показано, что штаммы Su2, Ki4 и Ki5 являются алкалофильными сульфатвосстанавливающими бактериями рода *Desulfonatronum*. Анаэробные ферментирующие бактерии штамма Su22 представляют собой новый род алкалофильных прокариот с ранее неизвестным типом метаболизма.

Ключевые слова: содовые озера, *Desulfonatronum* sp., алкалофилы.

Введение

Обитатели содовых озер находятся под воздействием высокого pH и повышенного осмотического давления. В высокоминерализованных содовых озерах сульфидогенез преобладает над метаногенезом на конечных стадиях разложения органического вещества [1]. Достижением последних лет стало описание ряда алкалофильных сульфатвосстанавливающих бактерий (АСВБ), представляющих роды *Desulfonatronovibrio, Desulfonatronum* и *Desulfonatronospira* [2]. Цель настоящей работы – исследование анаэробных бактерий, выделенных из содовых озер Южного Забайкалья, изучение их физиолого-биохимических свойств и определение таксономического положения.

Результаты и обсуждение

Из проб донных осадков озер Сульфатного и Киран были получены накопительные культуры, продуцирующие сероводород. Чистые культуры АСВБ штаммы Su2, Ki4 и Ki5 получены методом предельных разведений в жидких и на твердых средах, обогащенных лактатом и сульфатом. Клетки выделенных микроорганизмов представляли собой подвижные грамотрицательные вибрионы различного размера. Все полученные изоляты являются мезофилами и способны расти в диапазоне температур от 20 до 40^{0}C. Оптимальный рост штаммов Ki4 и Su2 наблюдался при 30^{0}C, штамма Ki5 – при 37^{0}C. Штамм Su2 рос в диапазоне pH от 8 до 11, с оптимальным ростом при pH 10. Штаммы Ki4 и Ki5 росли в диапазоне pH от 8 до 10, оптимально при pH 9,0 и 9,5 соответственно. Выделенные культуры принадлежат к облигатным алкалофилам. Рост штаммов зависел от присутствия NaCl в среде культивирования. Оптимальные значения NaCl для роста штаммов Su2, Ki4 и Ki5 составляли 2,0, 0,2 и 0,5% соответственно. Исходя из анализа продуктов окисления субстратов, исследуемые культуры осуществляли неполное окисление до ацетата и CO_2. Выделенные штаммы различались по спектру используемых доноров и акцепторов электронов, но все культуры использовали лактат и сульфат для роста и сульфидогенеза.

Выполнен почти полный секвенс последовательностей гена 16S рРНК штаммов Su2, Ki4 и Ki5, которые были депонированы в GenBank под номерами EU315313, EU315115 и GO227729 соответственно. Филогенетический анализ показал, что новые штаммы АСВБ кластируются с бактериями рода *Desulfonatronum*. На филогенетическом дереве их ближайшими соседями являются *D. lacustre* DSM 10312 (98,0-99,3% сходства).

Выделен упорный спутник АСВБ штамм Su22, сбраживающий дрожжевой экстракт и пептон. Клетки штамма представляли собой грамположительные неподвижные палочки. При оценке роста данного штамма на различных субстратах установлено, что наилучший рост он демонстрировал на водопроводной воде, содержащей дрожжевой экстракт и карбонатный буфер при pH 10. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (EU315116) показал, что ближайшим соседом новой бактерии является *Anoxynatronum sibiricum* (сходство 90,0%). Полученные данные полифазной таксономии позволяют утверждать, что штамм Su22 является представителем нового рода алкалофильных ферментирующих бактерий с уникальным типом метаболизма.

Таблица.

Основные характеристики анаэробных бактерий из содовых озер Сульфатное и Киран

Признак	Выделенные штаммы			
	Su2	Ki4	Ki5	Su22
Морфология	вибрион	вибрион	вибрион	палочка
Подвижность	+, монотрих	+, перитрих	+, монотрих	–
Окраска по Граму	–	–	–	+
pH диапазон	8,0-11,0	8,0-10,0	8,0-10,0	8,0-11,0
pH оптимум	9,2-9,4	9,0	9,5-9,6	10,0
Восстановление сульфата	+	+	+	–
Г+Ц, мол.%	59,6	56,3	48,8	46,1
Ближайший вид, % сходство	*D. lacustre*, 99,3%	*D. lacustre*, 98,0%	*D. lacustre*,98,5%	*A. sibiricum*, 90,0%

Представленные в таблице результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что все штаммы анаэробных бактерий являются облигатными алкалофилами и умеренными галофилами и представляют новые таксоны различного уровня.

Работа выполнена при поддержке грантов Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-ехнологического комплекса России на 2007–2013 годы".

ЛИТЕРАТУРА

1. *Заварзин Г.А.* Алкалофильные микробные сообщества // Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского. – М.: Наука, 2007. – С. 58–87.

2. *Sorokin D.Y., Kuenen J.G., Muyzer G.* The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes // Extremophiles. – 2011. – V. 2. – P. 1–16.

Ryzhmanova Y., Vainshtein M., Shcherbakova V.

ANAEROBIC BACTERIA OF SODA LAKES OF THE SOUTHERN BAIKAL

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia, *yanki2@rambler.ru*

Summary. The inhabitants of soda lakes are under the influence of high pH and high osmotic pressure. The aim of this study was to investigate the anaerobic bacteria isolated from soda lakes in the Southern Baikal, and the study of their physiological and biochemical properties and the determination of taxonomic status. It was shown that new strains Su2, Ki4 and Ki5 are the members of sulfate reducing bacteria of *Desulfonatronum* sp. Anaerobic fermentative bacterial strain Su22 represents a novel genus of alkalophilic bacteria with an unusual type of metabolism.

Key words: soda lakes, *Desulfonatronum* sp., alkalophiles.

УДК 579.832.4:577.113.5

Стародумова И.П.[1,2], Присяжная Н.В.[1,3], Арискина Е.В.[1]

ОЦЕНКА ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ *BREVUNDIMONAS* МЕТОДОМ ARDRA В СОЧЕТАНИИ С MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия, vkm@ibpm.pushchino.ru; [2]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пущинский государственный университет", г. Пущино, Россия; [3]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", г. Москва, Россия

Резюме. Проведено таксономическое изучение 18 штаммов рода *Brevundimonas,* выделенных из разных природных источников. С использованием рестрикционного анализа (ARDRA) и секвенирования генов 16SрРНК, в сочетании с MALDI-TOF масс-спектрометрией, обнаружено, по меньшей мере, пять групп штаммов, которые могут представлять собой новые виды рода.

Ключевые слова: *Brevundimonas*, MALDI-TOF MS, 16S рРНК, ARDRA.

Введение

Род *Brevundimonas* включает палочковидные бактерии с бинарным делением и простековые бактерии с ассиметричным делением и диморфным жизненным циклом, на одной из стадий которого клетки формируют полярную простеку с прикрепительным диском. Представители рода широко распространены природе (в пресноводных и соленых водоемах, в т.ч. загрязненных, различных типах почв и т.д.), а также обнаруживаются в клинических образцах. Уровень сходства 16S рРНК генов между видами *Brevundimonas* составляет 95,1 – 99,8%.

Метод рестрикционного анализа генов 16S рРНК (ARDRA), как правило, позволяет выявить группы организмов надвидового уровня. Анализ последовательностей генов 16S рРНК "работает" при идентификации бактерий на всех таксономических уровнях, но не пригоден для определения видовой принадлежности филогенетически близких организмов. MALDI-TOF масс-спектрометрия целых клеток – относительно новый метод с высокой степенью таксономического разрешения. Метод используется для идентификации и классификации близких бактерий, преимущественно на уровне "вид-подвид". Метод основан на использовании "мягкой" ионизации доступных и легкоионизируемых белков микроорганизмов. Сигналы масс-спектров в диапазоне от 2000 до 20000 m/z (отношение массы иона к его заряду) соответствуют, в основном, рибосомальным белкам.

Целью настоящей работы было таксономическое изучение 18 простековых и непростековых штаммов рода *Brevundimonas* из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов с использованием вышеупомянутых методов.

Материалы и методы исследования

Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК, секвенирование генов 16S рРНК и филогенетический анализ проводили как описано ранее [1]. Для MALDI-TOF MS анализа культуры выращивали на средах R2A (HiMedia)и ВКМ № 55 (http://www.vkm.ru/) при 28^{0}С в течение 48 ч. Отмытые клетки суспендировали в смеси ацетонитрил - вода (1:1) в присутствии 2,5% трифторуксусной кислоты, наносили на стальную пластинку-мишень и смешивали с равным объемом -циано-4-гидроксикоричной кислоты (матрица). Спектры регистрировали в линейном режиме с задержанной экстракцией ионов на AutoflexII (BrukerDaltonics), оборудованном азотным лазером с рабочей длиной волны 337нм, с время-пролетным анализатором масс и рефлектроном. Диапазон регистрируемых масс 2-20 кДа.

Результаты исследования и обсуждение

ARDRA-анализ исследуемого массива штаммов выявил пять групп, три из которых имели профили рестрикции, совпадающие с полученные *in silico* для типовых штаммов *B. basaltis, B. lenta* и *B. bullata*. Кроме того, обнаружены две группы штаммов с уникальными профилями, не совпадающими с таковыми известных организмов. У одного-двух штаммов каждой ARDRA-группы были определены последовательности генов 16S рРНК. Уровни сходства 16S рРНК штаммов внутри одной ARDRA-группы и с ближайшими типовыми штаммами варьировал от 99,8% до 97,6%, что находится в диапазоне значений для типовых штаммов видов *Brevundimonas.* Полученные данные и сведения об уровне таксономического разрешении метода свидетельствуют, что ARDRA-группы могут включать представителей пока не описанных видов *Brevundimonas.* Для оценки степени гетерогенности ARDRA-групп был применен метод MALDI масс-спектрометрии. Анализ спектров с использованием программы BioTyper 2.0 (BrukerDaltonics) показал, что большинство изученных штаммов существенно отличаются по MALDI масс-спектрам (рисунок) и, по всей вероятности, принадлежат к разным видам. Исключение составляют три группы штаммов: ВКМ В-1184, ВКМ В-1488, ВКМ В-1560, ВКМ В-1561 из ARDRA-группы "*B. Basaltis*" (общие пики с m/z 5365, 7093 и 9289), ВКМ В-1180 и ВКМ В-1486 из ARDRA-группы 1 (общие пики с m/z 6216, 6389, 7009, 7598), и пара ВКМ В-1191 и ВКМ В-1563 из ARDRA-группы "*B. Bullata*" (общие пики с m/z 6005, 6967, 8670). Имеющиеся по другим группам микроорганизмов данные, а также сравнение спектров штаммов, выращенных на разных средах, позволяют предполагать, что указанные груп-

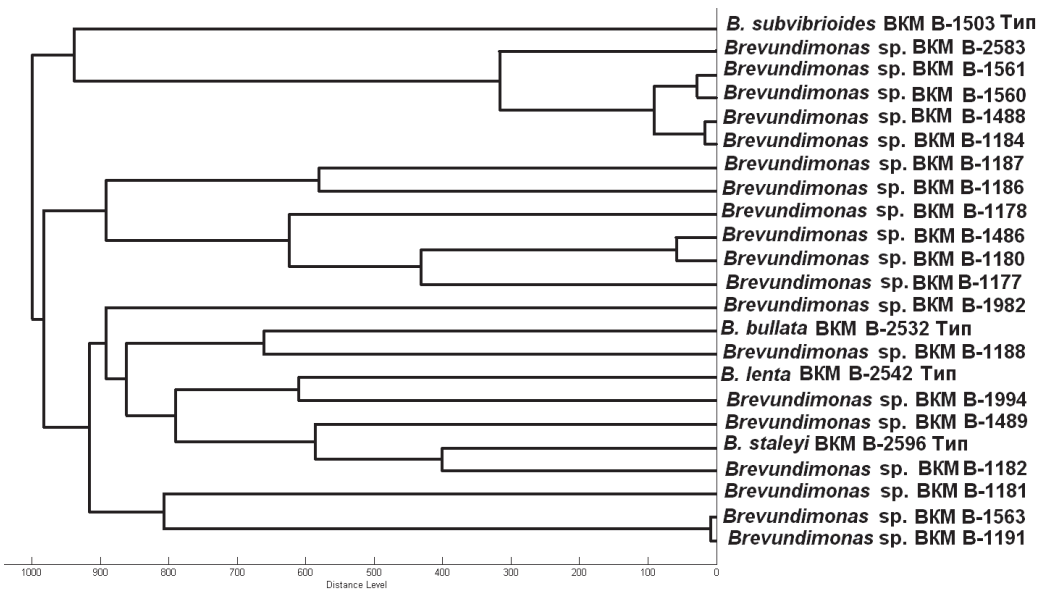


Рисунок. Дендрограмма MALDI-TOF масс-спектров бактерий рода *Brevundimonas.*

пы штаммов представляют три новых вида рода *Brevundimonas.* Кроме того, новые виды определенно представляют штаммы ВКМ В-2583 и ВКМ В-1176. Для подтверждения видового статуса представителей других кластеров и единичных штаммов необходимо применение дополнительных методов исследования.

Заключение

Таким образом, сочетание методов ARDRA и MALDI-TOF масс-спектрометрии для анализа массивов природных изолятов позволяет достаточно быстро идентифицировать штаммы на видовом уровне и выявить организмы, перспективные для дальнейших таксономических исследований и описания новых видов.

Работа выполнена при поддержке грантов Программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы".

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арискина Е.В., Черноусова Е.Ю., Лаптева Н.А., Акимов В.Н.* Оценка таксономического разнообразия простековых бактерий родов *Brevundimonas* и *Caulobacter*, выделенных из различных экосистем Евразии, с использованием анализа генов 16S рРНК // Микробиология. – 2011. – № 3. – С. 396–402.

Starodumova I.P. [1,2], Prisyazhnaya N.V.[1,3], Ariskina E.V.[1]

USING ARDRA AND MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY FOR THE SPECIES DIVERSITY ESTIMATION OF BACTERIA OF THE GENUS *BREVUNDIMONAS*

[1]G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, vkm@ibpm.pushchino.ru; [2]Pushchino State University, Pushchino, Russia; [3]M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Summary. The taxonomic investigation of 18 bacterial cultures of the genus *Brevundimonas* from VKM was carried out using the MALDI-TOF, amplified ribosomal DNA restriction analysis *(*ARDRA*)* and the sequencing of 16S rRNA gene. At least five new species of the genus *Brevundimonas* were revealed.

Key words: *Brevundimonas*, MALDI-TOF MS, 16S рРНК, ARDRA.

УДК 579.873.6+57.086.13

Шляпина Ю.Н.[1], Степина А.С.[1], КаменскихТ.Н.[2], Ившина И.Б.[1,2]

МЕТОДЫ КОНСЕРВАЦИИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КУЛЬТУР АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет", г. Пермь, Россия, ivshina@iegm.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, kamenskikh@iegm.ru

Резюме. Лиофилизация и криоконсервация – способы, наиболее эффективные для гарантированного долгосрочного сохранения микробных культур без потери их первоначальных свойств. Проведена оценка жизнеспособности культур родококков, поддерживаемых в течение 4–20 лет в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, www.iegm.ru/iegmcol). Установлено, что для долгосрочного хранения коллекционных культур *R. ruber* наиболее оправдано применение метода глубокого замораживания и высушивания – лиофилизации. Выявлена высокая криорезистентность родококков и перспективность использования метода криоконсервации при -85°С для их хранения. Экспериментально обосновано, что метод прижизненного окрашивания бактериальных клеток двухкомпонентным красителем Live\Dead® *Bac*Ligth™ Bacterial Viability Kit L1352 (Invitrogen™ Molecular Probes®, США) может быть использован для экспрессного контроля выживаемости длительно поддерживаемых коллекционных культур.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, лиофилизация, криоконсервация, жизнеспособность.

Введение

Актинобактерии рода *Rhodococcus* являются доминирующим компонентом микробного биоценоза, формирующегося в условиях углеводородного загрязнения окружающей среды. В Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН собрана обширная коллекция чистых идентифицированных штаммов родококков, ведущих активное окисление природных и антропогенных углеводородов [1]. Изучение биоразнообразия представителей этой группы и разработка на их основе современных биотехнологий очистки экосистем невозможны без надежного сохранения культур микроорганизмов по всем возможным показателям – количественным, генетическим, фенотипическим, физиолого-биохимическим. В результате долголетних экспериментальных исследований в коллекции испытаны и успешно применяются как традиционные, так и оригинальные методы консервации [2, 3], в том числе наиболее эффективные для долговременного хранения микроорганизмов – лиофилизация и криоконсервация. Цель настоящей работы – оценка жизнеспособности лиофилизованных и замороженных при -85°С коллекционных культур после их длительного хранения.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 71 штамм из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, www.iegm.ru/iegmcol), принадлежащий к видам *Dietzia maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *R. fascians R. opacus*, *R. ruber.* Культуры выращивали на мясопептонном агаре. Лиофилизацию клеток проводили в лабораторном сублиматоре OE-960 ("ЛАБОР МИМ", Венгрия) с использованием в качестве протектора сахарозо-желатинового агара [2]. Замораживание и последующее хранение культур при криоконсервации проводили в морозильнике сверхнизких температур MDF-U4086S при -85°С ("Sanyo", Япония). Низкотемпературную консервацию осуществляли без применения криопротекторов. Число жизнеспособных клеток определяли микрометодом точечных высевов по колониеобразующей способности [4]. В сравнительных экспериментах жизнеспособность культур параллельно оценивали методом специфического окрашивания бактерий двухкомпонентным красителем Live\Dead *Bac*Ligth Bacterial Viability Kit L1352, регистрируя живые и мертвые клетки с помощью люминесцентного микроскопа MC-400 F ("Micros", Австрия). Эффективность консервации оценивали по показателю выживаемости. Процент выживаемости родококков рассчитывали относительно числа клеток, определяемого до криоконсервации. Проверку сохранения физиолого-биохимических свойств бактериальных культур осуществляли путем контрольного определения ключевых признаков [2]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003, принимая уровень вероятности 95%.

Результаты и обсуждение

В результате исследования степени выживаемости коллекционных культур *R. ruber* после криоконсервации без применения протектора установлено, что в процессе длительного хранения наблюдалось некоторое (до 27,31%) снижение показателя выживаемости При этом число жизнеспособных клеток в замороженной суспензии оставалось значительным и соответствовало уровню 10^6-10^7 КОЕ / мл (см. таблицу), что свидетельствовало о высокой криорезистентности родококков и перспективности использования метода криоконсервации для их хранения.

Таблица.

Оценка жизнеспособности коллекционных штаммов *R. ruber* после криоконсервации при -85°С методом высева на плотную питательную среду

Штамм ИЭГМ	Число КОЕ / мл		Выживаемость, %	Число КОЕ/ мл через 4,5 года	Выживаемость, %
	до криоконсервации	через 1 год после криоконсервации			
71	(4,1 ± 0,40) Ч10^7	(2,7 ± 0,32) Ч10^7	65,85	(1,6 ± 0,22) Ч10^7	39,02
74	(5,5 ± 0,47) Ч10^7	(4,2 ± 0,48) Ч10^7	76,36	(1,9 ± 0,18) Ч10^7	35,55
83	(6,2 ± 0,50) Ч10^7	–	–	(2,0 ± 0,31) Ч10^7	32,26
231	(5,3 ± 046) Ч10^7	(3,0 ± 0,35) Ч10^7	56,60	(1,1 ± 0,14) Ч10^7	20,75
233	(5,0 ± 0,46) Ч10^7	(4,7 ± 0,26) Ч10^7	94,00	(2,2 ± 0,28) Ч10^7	44,00
235	(4,8 ± 0,44) Ч10^7	(4,4 ± 0,41) Ч10^7	91,67	(1,0 ± 0,20) Ч10^7	20,83
381	(3,7 ± 0,39) Ч10^7	(1,0 ± 0,14) Ч10^7	27,03	(2,8 ± 0,35) Ч10^6	7,57
468	(5,4 ± 0,47) Ч10^7	(3,7 ± 0,37) Ч10^7	68,52	(1,0 ± 0,13) Ч10^7	18,52

Применение метода дифференцирующего окрашивания клеток на живые и мертвые с использованием двухкомпонентного красителя Live\Dead (*Bac*Ligth Bacterial Viability Kit L1352) позволяло не только в короткие сроки контролировать уровень жизнеспособности культур после криоконсервации, но и изменение функций клеточной мембраны, в частности ее барьерных свойств. Так, учитывая тот факт, что один из компонентов красителя проникает только в бактериальные клетки с поврежденной мембраной, связываясь при этом с нуклеиновыми кислотами и окрашивая клетки в красный цвет, можно судить о степени изменений барьерных свойств в результате воздействия на бактерии низкой температуры.

В результате проверки жизнеспособности коллекционных культур, поддерживаемых в лиофилизованном состоянии в течение 20 лет, из 64-х успешно восстанавливались 47 штаммов, т.е. 73,4% от числа исследованных. Как видно из рисунка, наиболее устойчивыми к длительному хранению в лиофилизованном состоянии оказались представители *R. ruber* (79,2%). При этом максимальный (порядка 10^6 клеток в ампуле) уровень выживаемости выявлялся у сублимированных культур данного вида. Следует отметить, что наибольшее (75,0 и 79,2% соответственно) число жизнеспособных штаммов было обнаружено среди представителей, отличающихся наличием красного пигмента, в частности *D. maris* и *R. ruber*.

В результате сравнительного исследования уровня жизнеспособности представителей *R. ruber*, определяемого традиционным методом высева по числу КОЕ и экспрессным методом дифференцирующего окрашивания живых и мертвых клеток флуоресцентными красителями нуклеиновых кислот (Live\Dead® *Bac*Ligth™ Bacterial Viability Kit L1352 (Invitrogen™ Molecular Probes®, США), установлена положительная корреляция. Так, при 100%-ном содержании в анализируемом образце живых клеток, обладающих зеленой флуоресценцией, число КОЕ на МПА достаточно велико (10^3–10^6). И, наоборот, фактически 100%-ный уровень мертвых клеток, флуоресцирующих в красной области спектра, подтверждается отсутствием роста культуры на питательной среде, т.е. ее не жизнеспособностью. Общий уровень жизнеспособности представителей видов *R. erythropolis*, *R. opacus* и *R. fascians* после 20-ти летнего хранения в лиофилизованном состоянии регистрируется на критическом для гарантированного сохранения уровне и составляет в среднем 10^2 клеток на ампулу.

Выводы

В результате проведенных исследований экспериментально обосновано, что для долгосрочного хранения коллекционных культур *R. ruber* наиболее оправдано применение метода глубокого замораживания и высушивания – лиофилизации. Выявлена высокая криорезистентность родококков и перспективность использования метода криоконсервации при -85°С для их хранения. Установлено, что метод окрашивания живых и мертвых клеток с использованием красителя Live\Dead® *Bac*Ligth™ Bacterial Viability Kit L1352 (Invitrogen™ Molecular Probes®, США) может быть успешно использован для экспрессного контроля выживаемости длительно поддерживаемых коллекционных культур.

Работа поддержана грантами Президента РФ "Ведущие научные школы" НШ-64403.2010.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Биологическое разнообразие" (номер гос. регистрации 01200963679) и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (государственный контракт № 16.518.11.7069).

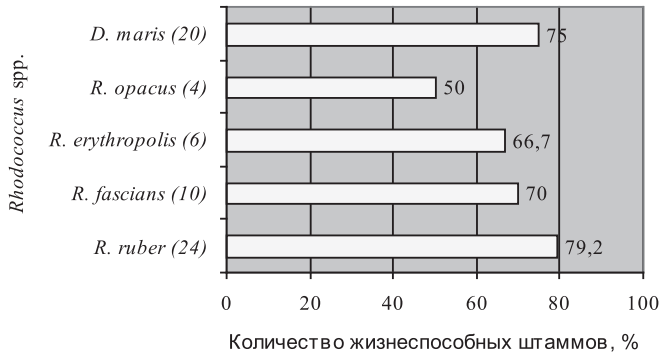


Рисунок. Влияние длительного хранения в лиофилизованном состоянии на жизнеспособность коллекционных штаммов (в скобках указано число исследованных штаммов каждого вида).

ЛИТЕРАТУРА

1. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collections of Alkanotrophic Microorganisms. 28.09.2011 (www.iegm.ru/iegmcol).
2. *Ившина И.Б., Каменских Т.Н., Куюкина М.С., Рычкова М.И., Шадрин О.А., Рыбалка Л.В., Зверева Л.В., Чумаков О.Б.* Методы консервации культур *Rhodococcus* spp. и их применение в практике поддержания специализированного фонда алканотрофных родококков // Микробиология. – 1994. – Т. 63. Вып. 1. – С. 118–127.
3. *Каменских Т.Н.* Консервация и гарантированное сохранение родококков *ex situ*: автореф. дис. … к.б.н.: 03.00.07. Пермь, 1998. – 20 с.
4. *Веслополова Е.Ф.* Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // Микробиология. – 1995. – Т. 64. № 2. – С. 279–284.

Shlyapina Yu.N.[1], Stepina A.S.[1], Kamenskikh T.N.[2], Ivshina I.B.[1,2]

CONSERVATION TECHNIQUES FOR *RHODOCOCCUS* COLLECTION CULTURES

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, kamenskikh@iegm.ru

Summary. Lyophilization and cryoconservation are the most efficient methods for guaranteed long-term preservation of microbial cultures and maintenance of their initial properties. Viability tests of *Rhodococcus* cultures stored at the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (acronym IEGM, WFCC # 768, www.iegm.ru/iegmcol) during 4 to 20 years were performed. It was determined that the most efficient conservation method for *R. ruber* collection cultures appeared to be deep freezing and drying, i.e. lyophilization. Rhodococci proved to be highly cryoresistant, thus, cryoconservation at -85° is considered a promising method for these cultures. It was experimentally founded that an intravital staining technique using a two-component stain Live\Dead® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit L1352 (Invitrogen™ Molecular Probes®, USA) could be applied to cultures long preserved in a dormant state to test their viability.

Key words: *Rhodococcus*, lyophilization, cryoconservation, viability.

УДК 593.161

Шолохова К.Н.[1], Плотников А.О.[2]

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ НОВОГО ВИДА ГАЛОФИЛЬНЫХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ ГЕТЕРОЛОБОЗНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ *PHARYNGOMONAS* SP.

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Оренбургский государственный университет”, г. Оренбург, Россия, ssscasca@mail.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, protoz@mail.ru.

Резюме. Изучен жизненный цикл нового вида галофильных гетеролобозных эукариотических микроорганизмов *Pharyngomonas* sp. Установленно, что жизненный цикл изучаемой культуры *Pharyngomonas* sp. включает жгутиковую форму, амебоидную форму, цисты, которые последовательно сменяют друг друга. Установлена оптимальная температура для развития исследуемой культуры 27°С.

Ключевые слова: галофильные микроорганизмы, протисты, *Heterolobosea*, *Pharyngomonas*.

Введение

Водоемы с повышенной соленостью широко распространены по земному шару и характеризуются разнообразием химического состава и населяющих их организмов [1]. В то же время галофильные микроорганизмы, населяющие гипергалинные водоёмы, остаются слабо изученными. Особенно актуально это для эукариотических микроорганизмов – протистов, галофильные гетеротрофные представители которых были выделены из соленых водоемов в чистой культуре и описаны только в XXI веке [2]. Среди описанных шести видов галофильных гетеротрофных протистов четыре относятся к классу Heterolobosea, который в настоящее время рассматривается как наиболее древний таксон эукариотических одноклеточных на современной Земле. Характерной особенностью этого таксона является наличие среди его представителей разных жизненных форм – амебоидных клеток, жгутиконосцев и цист. В связи с этим целью нашего исследования стало изучение жизненного цикла нового вида галофильного гетеролобозного протиста, выделенного из гипергалинного оз. Дунино сотрудниками Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН и предварительно отнесенного к роду *Pharyngomonas*.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служила чистая культура нового вида галофильного микроорганизма. В качестве питательной среды использовали синтетическую минерализованную среду Шмальца-Прата с подкормкой суспензией *Pseudomonas fluorescens*. Культивирование осуществляли следующим образом: в чашку Петри диаметром 5 см с 5 мл среды и подкормкой добавляли 0,1 мл культуры протистов, инкубировали при комнатной температуре в течение месяца. Ежедневно под световым микроскопом с увеличением в 400 раз осуществляли подсчет жизненных форм в 20 полях зрения.

Результаты и обсуждение

В ходе нашего исследования был изучен жизненный цикл нового вида галофильного гетеротрофного гетеролобозного протиста *Pharyngomonas* sp. и установлено влияние температуры на развитие данной культуры. Было установлено, что цикл развития исследуемого микроорганизма включает в себя жгутиковые клетки, амебоидные формы и цисты. Полный жизненный цикл составил 28 дней, в котором преобладали амебоидные формы, появляющиеся на вторые сутки и достигавшие своей максимальной численности на 15 сутки (рисунок). Жгутиковые клетки появлялись на четвертые сутки, достигали своей максимальной численности на седьмые сутки, затем их численность постепенно снижалась и к двадцать пятому дню они полностью исчезали из культуры. Цисты наблюдались с первых дней культивирования и их численность в дальнейшем превысила численность жгутиковых и амебоидных форм.

В нашем эксперименте изучалось влияние четырех различных температур: 7°С, 27°С, 30°С и 36°С. Было установлено, что наибольшее развитие исследуемой культуры происходило при 27°С. Жгутиковые клетки быстрее появлялись при температуре 30°С, но численность их оставалась незначительной. При температуре 36°С жгутиконосец достигал своей максимальной численности на 11 сутки, затем численность снижалась. Наиболее оптимальной температурой для жгутиковых клеток оказалась 27°С, т.к. при данной температуре общая численность жгутиковых клеток была максимальной. Для амебоидных форм оптимальной температурой была так же 27°С,

Рисунок. Жизненный цикл нового вида галофильного гетеротрофного гетеролобозного протиста *Pharyngomonas* sp.

т.к. именно при этой температуре они достигали своей максимальной численности. Цисты при 36°С появлялись уже на первые сутки, при 27°С и 30 °С - только на пятые. Наибольшей численности они достигали при 30°С.

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что жизненный цикл изучаемой культуры нового вида галофильного гетеротрофного гетеролобозного протиста *Pharyngomonas* sp. включает жгутиковую форму, амебоидную форму, цисты, которые последовательно сменяют друг друга. Установлен оптимальный диапазон температуры для исследуемой культуры - 27°С.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Javor B*. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. – Berlin: Springer-Verlag, 1989. – 328 p.

2. *Park J.S.*, *Simpson A.G.B*. Characterization of *Pharyngomonas kirbyi* (= “Macropharyngomonas halophila” nomen nudum), a very deep-branching, obligately halophilic heterolobosean flagellate // Protist. – 2011. – V. 162. – № 5. – P. 691–709.

Sholohova K.N.[1], Plotnikov A.O.[2]

LIFE CYCLE OF A NEW SPECIES OF HALOPHILIC EUKARYOTIC HETEROTROPHIC GETEROLOBOSEAN MICROORGANISM *PHARYNGOMONAS SP.*

[1]Orenburg State University, Orenburg, Russia, ssscasca@mail.ru; [2]Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia, protoz@mail.ru

Summary. The life cycle of a new species of halophilic geterolobosean eukaryotic microorganism *Pharyngomonas sp.* was studied. It is established that the life cycle of the studied culture *Pharyngomonas sp*. includes flagellate form, amoeboid form and cysts, which follow each other consecutively. The optimal temperature for the studied culture was 27°C.

Key words: halophilic microorganisms, protists, *Heterolobosea*, *Pharyngomonas*.

УДК 579.61:616-092, 579.262

Бухарин О.В.

СИМБИОЗ – БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА ИНФЕКЦИИ

Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, ikvs@esoo.ru

Резюме. Инфекционный процесс представлен в качестве модельной системы ассоциативного симбиоза с 3 функциональными векторами взаимодействия симбионтов. Взаимоотношения хозяина и доминантной микрофлоры определяют его колонизационную резистентность – физиологическую регуляторную систему, контролирующую проникновение эндо- и экзогенных патогенов. Рассмотрены синергидные функции доминантных микросимбионтов для хозяина. Оценена роль персистентного потенциала ассоциантов, способствующего выживанию бактерий при инфекции. В условиях микросимбиоценоза разработан алгоритм микробного распознавания "свой-чужой" под контролем оппозитного (усиление/подавление) влияния микроорганизмов пары "доминант – ассоциант" на основные физиологические (ростовые и персистентные) функции микросимбионтов.

Ключевые слова: симбиоз, инфекция, микробное распознавание "свой-чужой".

Еще в 1879 г. А. де Бари определил "симбиоз – как продолжающееся тесное совместное существование различных организмов, где паразитизм является наиболее известной и очевидной формой симбиоза".

В последнее время появился новый термин – "ассоциативный симбиоз", представляющий многокомпонентную интегральную систему, включающую хозяина в качестве макропартнера, стабильный доминантный микросимбионт(ы) (нормальная, индигенная микрофлора) и минорные ассоциированные микросимбионты (патогенные, условно-патогенные и др. микроорганизмы) с разнонаправленными воздействиями, определяющими формирование и стабильность существования симбиоза. Ассоциативный симбиоз и инфекция имеют общее структурно-функциональное сходство, в связи с чем инфекционный процесс рассматривается как модельная система ассоциативного симбиоза, включающая 3 функциональных вектора взаимодействия симбионтов: 1) хозяин – доминантный партнер; 2) хозяин – ассоциативные микроорганизмы; 3) микросимбиоценоз.

Взаимоотношения хозяина и доминантной микрофлоры, как известно, определяют его колонизационную резистентность, представляющую физиологическую регуляторную систему, контролирующую проникновение эндогенных и экзогенных патогенов.

Синергидные функции доминантных микросимбионтов для хозяина включают: метаболизм нормофлоры за счет собственного ферментного набора, "дорасщепляющего" углеводные, жировые и белковые субстраты пищи; синтез витаминов группы В ("биофабрика" витаминов); защита хозяина от ассоциативных микроорганизмов за счет прямого антагонизма, антиперсистентного действия и потенцирующего эффекта нормофлоры с факторами эндогенной защиты в отношении аллохтонных патогенов; иммуномодулирующий эффект нормофлоры; детоксицирующее действие анаэробной нормофлоры, выполняющей роль «второй печени».

При взаимодействии хозяина и нормофлоры установлено, что для каждого биотопа существует свой "ключевой" (основной) вид(ы) индигенных представителей, обладающих набором характеристик микробного антагонизма в защите биотопа; формирование нормофлоры в биотопе определяют его морфофункциональные особенности и степень защищенности от патогенов различными антимикробными субстратами (лизоцим, интерферон, лактоферрин, карнозин и др.).

Включение в ассоциативный симбиоз бактерий – ассоциантов приводит к разным исходам инфекции, что зависит от патогенного/персистентного потенциала ассоциантов – "патогенассоциированных молекулярных паттернов" (ПАМП), их способности преодолевать распознающие механизмы врожденного иммунитета хозяина – "паттернраспознающие рецепторы" (ПРР), определяющие стереотипные и консервативные в эволюции молекулы, присущие большим систематическим группам микроорганизмов.

Защитные субстраты биотопов хозяина преодолеваются ассоциантами за счет наличия антифакторов (антилизоцимная, антикарнозиновая, антилактоферриновая, антииммуноглобулиновая и др. активности), способствующих выживанию (персистенции) бактерий при инфекции.

Присутствие в ассоциативном симбиозе бактерий-ассоциантов неоднозначно для микросимбиоценоза – от усиления нормофлоры хозяина (защита организма) до прямого антагонизма ассоциантов (интерференция, вытеснение доминантных микросимбионтов) с формированием дисбиоза.

Разработан алгоритм микробного распознавания "свой-чужой" под контролем феномена оппозитного (усиление/подавление) влияния микроорганизмов пары "доминант-ассоциант" на основные физиологические (ростовые, персистентные) функции в условиях микросимбиоценоза.

В рамках концепции ассоциативного симбиоза расшифрован механизм колонизационной резистентности хозяина (на модели репродуктивного тракта женщин), где антагонизм перекись продуцирующих лактобацилл по отношению к патогенам отменяется путем подавления активности их антиокислительных ферментов. Защита патогенов с помощью каталазы от гидроксильных радикалов лактобацилл блокируется при помощи ингибитора каталазы лактобацилл. Обнаружена протективная способность кишечной палочки от токсического действия гидроксильных радикалов, образующихся в реакции Фентона.

Перспективы симбиотического подхода к инфекции позволяют: определить методические подходы к решению ключевого вопроса "свой – чужой" при реализации симбиотических отношений; изучить механизмы транслокации патогенов в биотопе для расшифровки патогенеза различных форм инфекционной патологии; разработать критерии отбора пробиотических штаммов и предложить на этой основе модель создания новых поликомпонентных пробиотиков; найти новые методические ключи структурно-функциональной оценки биоценозов хозяина для диагностики и прогнозирования исходов различных состояний организма; оценить возможности использования сигнальных молекул межклеточного общения микробов в качестве терапевтических средств при инфекциях.

Bukharin O.V.

SYMBIOSIS – BIOLOGICAL BASIS OF INFECTION

Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia, ikvs@esoo.ru

Summary. Infection is considered as a model system of associative symbiosis with functional vectors of interaction of symbionts. Interactions of host and dominant microflora determine its colonizing resistance – the physiological regulatory system controlling the penetration of endo- and exogenous pathogens. Synergistic functions of dominant microsymbionts for a host have been reviewed. Role of associants persistent potential promoting the survival of bacteria when being infected has been estimated. Under conditions of microsymbiocenosis, algorithm has been developed for microbial recognition of "self-nonself" under the control of opposite (increase/supression) influence of microorganisms of the pare of "dominant-associant" on the basic physiological (growth and persistent) functions of microsymbionts.

Key words: symbiosis, infection, microbial recognition of "self-nonself".

УДК 579.873.71:57.042

Балцат К.К.[1], Постолакий О.М.[2], Плешка Т.А.[1], Бурцева С.А.[2]

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ШТАММОВ СТРЕПТОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ МОЛДОВЫ

[1]Государственный университет Молдовы, г. Кишинев, Молдова, ka2088@mail.ru;

[2]Институт Микробиологии и Биотехнологии АНМ, г. Кишинев, Молдова, oleseap@yahoo.com

Резюме. Из образцов почвы Молдовы выделены новые штаммы стрептомицетов и изучена их активность роста. Определено количество биомассы после роста на комплексной среде (5,3-12,5 г/л). Установлена способность задерживать рост фитопатогенных бактерий, особенно *Clavibacter michiganensis.* Обработка семян кукурузы растворами экзометаболитов стрептомицетов стимулировала увеличение количества корней (на 13,8-19,4%), их длины (на 9,7-22,8%) и длины колеоптелей (на 9,4-38,1%). Проведенные исследования показали, что новые штаммы стрептомицетов обладают антимикробными свойствами и могут рассматриваться как потенциальные продуценты регуляторов роста растений.

Ключевые слова: стрептомицеты, фитопатогены, антимикробная активность, фитогормональная активность.

Введение

В настоящее время интенсивно проводятся исследования по поиску новых биологически активных природных соединений. Большинство из них являются метаболитами микроорганизмов. Известно, что наиболее важный источник новых антибиотических веществ – актиномицеты, которые представляют уникальную группу прокариотов-микроорганизмов, сочетающих молекулярные, химические, физиологические особенности прокариотов с морфологическими признаками эукариотических грибов [1].

Стрептомицеты синтезируют биологически активные вещества различных классов химических соединений, обладающие антибактериальным, противоопухолевым и антигрибковым действием. Обнаружены культуры с противовирусными, инсектицидными и антигельминтными свойствами, разлагающие синтетические гербициды и другие труднодоступные соединения [2].

Большой интерес представляют микробные препараты, способные стимулировать развитие культурных растений и угнетать рост сорняков. Актиномицеты в процессе жизнедеятельности синтезируют, кроме антибиотиков, и витамины, аминокислоты, ауксины, которые используют в растениеводстве. Эти вещества влияют на ростовые процессы растений – стимулируют прорастание семян, повышают урожайность [3].

Культуры новых видов стрептомицетов представляют интерес как неизученные источники новых природных соединений. Проводимое в последние годы интенсивное изучение их биологической активности показало, что они являются перспективными при выявлении новых природных соединений и заслуживают более широкого и глубокого изучения не только в теоретическом плане, но и для решения ряда проблем медицины и сельского хозяйства. Исходя из вышесказанного, целью исследований являлось изучение биологической активности стрептомицетов, выделенных из разных почвенных образцов центральной части Молдовы.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах стрептомицеты были отобраны по критерию коэффициента активности роста, антимикробной активности и продуктивности биомассы. По коэффициенту активности роста наибольший интерес представляли штаммы *Clavibacter michiganensis* 11, 34, 49, 52, 151 и 154. Следует отметить, что активность роста практически не зависела от типа почвы.

Изучение продуктивности биомассы стрептомицетов показало, что максимальное количество ее получено после роста на среде М-I у *Clavibacter michiganensis* 49 – 12,5 г/л сухой биомассы. У остальных штаммов количество образуемой биомассы варьирует от 5,3 до 7,13 г/л.

Молдавские коммерческие гибриды кукурузы характеризуются средней устойчивостью к засухе и фитопатогенам, что ведет к значительным потерям урожая. По мнению некоторых исследователей, актиномицеты составляют от 12 до 20% из общей биомассы почвенных микроорганизмов и играют важную роль в жизни растений.

В наших опытах мы выявили способность новых штаммов стрептомицетов задерживать рост таких фитопатогенных бактерий, как *Xanthomonas campestris 8003* и *Clavibacter michiganensis 10*. Активнее всего задерживали рост *Clavibacter michiganensis 10 штаммы* № 151 и 154 (диаметр зоны задержки роста 20,0 и 25,0 мм соответственно).

Следующим этапом наших исследований было изучение способности стрептомицетов синтезировать регулирующие рост растений вещества, т.е. вещества с фитогормональной активностью.

Обработка семян кукурузы (Гибрид Дебют, создан в Институте Генетики и Физиологии растений АНМ; сорт районирован по Молдове) растворами экзометаболитов изучаемых штаммов стрептомицетов по-разному влияла на корнеобразование.

Опыты показали, что стрептомицеты способны синтезировать вещества, стимулирующие не только корнеобразование, но и развитие колеоптелей, причем выявлены штаммы, обладающие способностью одновременно стимулировать и корнеобразование (увеличение количества корней на 13,8-19,4%), и образование колеоптелей: изменение их длины варьировало от 109,7 до 122,8% и от 109,4 до 138,1% соответственно к контролю.

Таким образом, установлено, что экзометаболиты стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, обладают антимикробными свойствами и существенным образом влияют на количество и прирост длины корней и колеоптелей, а также на увеличение массы, что позволяет рассматривать эти штаммы как потенциальные продуценты регуляторов роста растений. Биопрепараты, приготовленные на их основе, могут с успехом применяться в растениеводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces.* Описание видов и компьютерная программа их идентификации. Киев, Наукова думка, 2003. – с. 648.

2. Преображенская Т.П. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Наука, 1990. – с. 3–4.

3. Бурцева С.А. Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения). Автореф. дис. док. хаб. биол. наук. Кишинев, 2002. – С. 39.

Baltsat K.K.[1], Postolakyi O.M.[2], Pleshka T.A.[1], Boortseva S.A.[2]

BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW STREPTOMYCETE STRAINS ISOLATED FROM MOLDAVIAN SOIL

[1] Moldavian State University, Kishinev, Moldova ka2088@mail.ru; [2] Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM, Kishinev, Moldova, MD-2028 oleseap@yahoo.com

Summary. Some new streptomycete strains were isolated from Moldavian soil and their growth activity was studied. The biomass quantity of analyzed strains after the cultivation on liquid complex media was determined (5.3-12.5 g/l). Depressive growth of phytopathogenic bacteria, especially *Clavibacter michiganensis*, under the influence of new streptomycetes was detected. Maize seeds treatment with culture filtrates containing the streptomycete exometabolites complex demonstrated the stimulation of the amount of roots (up to 13.8-19.4%), their length (9.7-22.8%), and coleoptiles' length (9.4-38.1%). Thus, new strains of analyzed streptomycetes possess an antimicrobial activity and can be considered as potential producers of plant growth regulators. Biopreparations prepared on their basis can be successfully applied in crop production.

Key words: streptomycetes, phytopathogens, antimicrobial activity, phytohormonal activity.

УДК 604.2:547.458:633.11

Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ БИОПРЕПАРАТОМ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

“Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва”, г. Саранск, Россия, julenja@bk.ru

Резюме. Подобраны оптимальные концентрации растворов ксантана (0,05%) и декстрана (0.3%) для предпосевной обработки семян пшеницы биопрепаратом. При этом значения энергии прорастания превысили контрольные на 10 и 6%, всхожести - на 11 и 7% соответственно. Показана устойчивость обработанных семян пшеницы к действию фитопатогена *Fusarium culmorum*.

Ключевые слова: ксантан, декстран, биопрепарат, фитопатоген.

Введение

В растениеводстве большое значение придается исследованиям различных сторон физиологии развития семян, разработке эффективных методов их предпосевной обработки, обеспечивающих активный рост и высокую продуктивность сельскохозяйственных культур. Альтернативой химическим удобрениям является использование биопрепаратов на основе бактерий, обитающих в почве. Путем длительной селекции из их числа отбирают микроорганизмы, которые хорошо приживаются в ризосфере или на корнях растений и оказывают положительное действие на рост и развитие сельскохозяйственных культур. Необходимым условием запуска физиолого-биохимических процессов, приводящих к началу роста зародыша семени, является наличие достаточного количества воды, что возможно при нанесении на посевной материал влагоудерживающих веществ. В качестве таковых можно использовать полисахариды, которые благодаря клейкости способствуют также прикреплению бактерий к поверхности семян.

В работе исследовали всхожесть семян пшеницы и их устойчивость к фитопатогенам при предпосевной бактеризации с использованием полисахаридов. В задачи входило: подбор оптимальной концентрации полисахаридов при обработке семян пшеницы биопрепаратом; изучение энергии прорастания и всхожести обработанных семян в процессе хранения; исследование устойчивости проростков пшеницы к воздействию фитопатогена.

Материалы и методы исследования

Биопрепарат получен путем глубинного культивирования нового штамма *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе в оптимизированных условиях. Для проведения эксперимента были отобраны семена пшеницы сорта «Туляйковская 10», которые в количестве 100 штук обрабатывали путем распыления раствора биопрепарата, разведенного в 200 раз, с добавлением полисахаридов [1]. Концентрации растворов полисахаридов выбирали индивидуально для каждого в соответствии с их вязкостью: декстран – 0,2%, 0,3%, 0,5%; ксантан – 0,01%, 0,05%, 0,1%. Более высокие концентрации полисахаридов образуют вязкие растворы, при обработке которыми наблюдается слипание семян. В контрольном варианте использовали водопроводную воду. Энергию прорастания семян определяли через 3 сут., а всхожесть – через 7 сут. в течение всего периода хранения обработанного зерна (15 сут.). Для исследования устойчивости ростков пшеницы к фитопатогену *Fusarium culmorum* семена высаживали в искусственно зараженный грунт.

Результаты и обсуждение

В ходе работы было показано, что биообработка повышает ростовые показатели семян пшеницы. Из всех исследуемых концентраций ксантана 100%-ый результат энергии прорастания достигнут в варианте с 0,05%-ым раствором, что выше контрольного значения на 10%. В опыте с декстраном оптимальная концентрация раствора составила 0,3%. При этом исследуемый показатель превысил контроль на 6%. В остальных вариантах опыта значения энергии прорастания были выше контрольного на 2-4%. При определении всхожести семян максимальный эффект наблюдался в тех же вариантах опыта, что и энергия прорастания (ксантан - 100%, декстран - 96%). Согласно литературным данным [2], положительное влияние обработки семян бактериальной суспензией обусловлено способностью бактерий рода *Pseudomonas* к синтезу веществ фитогормональной природы. Дополнительное использование полисахаридов позволяет оптимизировать условия прорастания зерна за счет удержания влаги в процессе набухания.

Важным условием предпосевной обработки является продолжительное присутствие бактерий на поверхности зерна без потери их ростостимулирующего действия. Данные по определению ростовых показателей, исследуемых в течение 15-ти суток хранения посевного материала, свидетельствуют о сохранении положительного эффекта биообработки. К концу рассматриваемого срока хранения зерна максимальные ростовые показатели практически не изменились в вариантах обработки с ранее оптимально подобранными концентрациями полисахаридов (таблица).

При выращивании в грунте злаковые культуры часто инфицируются грибами, вызывающими различные заболевания, что приводит к снижению урожайности и качества готовой продукции. При исследовании наблюдалось динамическое развитие опытных растений в искусственно зараженном грунте без признаков инфицирования, в то время, как в контроле уже на 7-е сутки роста были отмечены пораженные участки и частичная гибель ростков (23%).

Таблица.

Энергия прорастания семян пшеницы при различных сроках хранения

Время хранения, сут.	Контроль	Концентрация полисахаридов, %					
		Ксантан			Декстран		
		0.1	0.05	0.01	0.5	0.3	0.2
1	90±1	94±2	100±1	94±2	93±2	96±1	94±1
5	86±3	92±2	100±2	93±1	91±2	95±1	92±1
10	83±1	90±3	99±1	93±2	89±1	94±1	90±3
15	78±2	90±1	99±1	92±1	88±1	95±2	90±1

Анализ полученных данных показывает, что биологическая обработка семян пшеницы бактериальной суспензией *Pseudomonas aureofaciens* 2006 в комплексе с полисахаридами увеличивает всхожесть посевного материала и устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым фитопатогеном *Fusarium culmorum.*. Максимальный эффект достигается при использовании растворов с концентрациями – 0,05 % ксантана и 0,3 % декстрана.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ревин В.В., Ибрагимова С.А.* Патент РФ 2421967, МПК A01C1/06. Способ получения оболочки для предпосевной обработки семян / Опубл. 27.06.2011. Бюл. №18. - 3 с.

2. *Боронин А.М.* Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - № 10. - С.25 - 31.

Burova Ju.A., Ibragimova S.A., Revin V.V.

USE OF POLYSACCHARIDES AT PROCESSING OF SEEDS OF WHEAT BY THE BIOLOGICAL PRODUCT

Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia,

julenja@bk.ru

Summary. Was selected the optimal concentration of solutions of xanthan (0.05%) and dextran (0.3%) for pre-treatment of wheat seed by the biopreparate. The values of energy of germination exceeded the control at 10 and 6%, germination - by 11 and 7% respectively. The resistance of the treated seeds of wheat to the action of phytopathogen *Fusarium culmorum* was shown.

Key words: xanthan, dextran, biologic preparate, phytopathogen.

УДК 579.84+577.114.083

Величко Н.С.[1], Смолькина О.Н.[1], Староверов С.А.[1], Дыкман Л.А.[1], Игнатов В.В.[1,2]

ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА БАКТЕРИЙ *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* Z78

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия, room105@ibppm.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского”, г. Саратов, Россия, vvignatov@mail.ru

Резюме. Из внешней мембраны бактерий *Herbaspirillum seropedicae* Z78 модифицированной экстракцией по Галаносу получен препарат ЛПС. Показано, что общий пул мембранного ЛПС содержал в основном молекулы R-формы. В выделенном препарате были найдены все характерные компоненты ЛПС, а именно: углеводы, КДО, гептозы и гидроксиалкановые кислоты липида А. Показано, что полисахаридная часть ЛПС на 80% состоит из 1,2,3,4-бутантетраола и на 20% из Rha, Man, Glc, Gal, GlcN и GalN. С использованием овечьей фаговой библиотеки антител получены миниантитела к ЛПС. Проведено исследование антигенного состава выделенного ЛПС.

Ключевые слова: *Herbaspirillum seropedicae* Z78, О-антиген, миниантитела.

Бактерии рода *Herbaspirillum*, принадлежащие к β-субклассу Proteobacteria, являются эндофитными ассоциативными азотфиксаторами [1]. В процессы узнавания микроорганизма макрохозяином вовлечены одни из основных компонентов бактериальной поверхности – капсульные и мембранные (липополисахариды (ЛПС) или О-антигены) гликополимеры. Известно, что иммунохимический подход, наряду с деструктивными химическими методами, оказывается весьма информативным при изучении особенностей строения бактериальной поверхности и роли тех или иных структур при установлении контактных взаимодействий. В 90-х годах прошлого века появился новый комбинаторный подход к разработке рекомбинантных Ат. Фаговая система заменяет все этапы работы по иммунизации животных процедурами манипулирования с ДНК и бактериями, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих Ат, и удешевляя этот процесс. Работа просвещена выделению, химической и иммунохимической характеристике ЛПС *H. seropedicae* Z78.

Культуру *H. seropedicae* Z78 выращивали на жидкой синтетической среде с малатом и глюкозой до окончания экспоненциальной фазы роста. Клетки отделяли от культуральной жидкости и отмывали от капсулы. Электрофоретический анализ показал, что в пуле мембранного ЛПС преобладала R-форма молекул. Для выделения ЛПС использовали метод Галаноса, с последующей двукратной обработкой клеток дистиллированной водой в течение 2 ч при 68°С. Выход ЛПС составил 6% от веса сухих микробных клеток. Биохимические исследования ЛПС показали наличие углеводов (~ 9%), 2-кето-3-дезоксиоктоновой кислоты (КДО) (~ 2%) и полное отсутствие нуклеиновых кислот. Методом ГЖХ в составе липида А ЛПС *H. seropedicae* Z78 в виде метиловых эфиров были найдены 3-OH-$C_{10:0}$, 3-OH-$C_{12:0}$, 2-OH-$C_{12:0}$, 3-OH-$C_{12:0}$, $C_{14:0}$, 2-OH-$C_{14:0}$ и $C_{16:0}$ жирные кислоты. Сумма гидроксикислот в образце ЛПС составила ~ 63%, что согласуется с литературными данными о количестве оксикислот в липидах А.

Мягким кислотным гидролизом ЛПС с последующим отделением нерастворимого в воде осадка липида А и разделением водорастворимой части на Sephadex G-50 были получены две фракции, соответствующие О-специфическому полисахариду (ОПС) и олигосахариду кора. Гельхроматография кора на Toyopearl HW-40 позволила разделить его на две фракции корI и корII. Анализ моносахаридного состава препарата ОПС в виде ацетатов полиолов выполняли методом ГЖХ-МС. Было показано, что ОПС на ~ 80% состоял из остатков 1,2,3,4-бутантетраола и ~ на 20% из рамнозы (Rha), маннозы (Man), глюкозы (Glc), галактозы (Gal), глюкозамина (GlcN) и галактозамина (GalN). Наличие в составе ОПС неуглеводного компонента могло объяснить низкое содержание углеводов в препарате ЛПС. В корI были выявлены Rha, Man, Glc, Gal, GlcN, GalN, и гептоза (Hep), а в кор II - Rha, Glc, Gal, GlcN, Hep (преобладала). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что повторяющееся звено ОПС построено в основном из 1,2,3,4-бутантетраола, а большая часть остальных обнаруженных в ОПС сахаров являются составляющими корового олигосахарида. Необходимо отметить, что остатки полиолов являются неотъемлемой частью тейхоевых кислот грамположительных бактерий. Однако существуют данные, указывающие на наличие остатков спиртов в структуре повторяющихся звеньев ЛПС грамотрицательных микроорганизмов [2].

С использованием овечьей фаговой библиотеки антител были получены фаговые миниантитела к ЛПС (м-$Ат_{лпс}$). Селекцию специфических м-$Ат_{лпс}$ проводили с использованием фагового дисплея антител, любезно предоставленного профессором У. Харрисом (Университет Абердина, Великобритания), состоящего из вирусных частиц бактериофага M13, несущих, помимо рецепторных белков (pIII), несколько копий scFv-белков (вариабельные домены иммуноглобулинов овцы). Для отбора специфических антител антигены сорбировали на полистироле. Было проведено 4 раунда селекции бактериофагов к выделенным препаратам гликополимеров. Компетентными вирусами инфицировали клетки *Escherichia coli* XL-1 Blue и после трехдневной инкубации из культуральной жидкости выделяли м-$Ат_{лпс.}$ Увеличение специфичности м-Ат оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Измерение оптической плотности в UV-диапазоне с пересчётом на вирусные частицы позволило определить количество бактериофагов в конечном диализате, составившее 1×10^{13} частиц/мл.

Эксперименты по ингибированию взаимодействия м-$Ат_{лпс}$ с ЛПС проводили в твердофазном ИФА. В качестве ингибиторов были взяты ОПС, кор, а также коммерческие препараты – Rha, Gal, Glc, GlcN и альтроза (Altr) (в качестве отрицательного контроля). Показано, что кор полностью ингибировал м-$Ат_{лпс}$. ОПС также ингибировал м-$Ат_{лпс}$, но в меньшей степени. Altr не оказывала ингибирующего действия на м-$Ат_{лпс}$. Glc, Gal, GlcN одинаково ингибировали м-$Ат_{лпс}$, но сильнее чем ОПС. На основании этих результатов можно сказать, что полученные нами м-$Ат_{лпс}$ образовались преимущественно к коровой области, а ингибирование м-$Ат_{лпс}$ широким набором сахаров, вероятно, указывает на значительную разветвленность и гетерогенность корового олигосахарида.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ 11-04-00533-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Baldani J.I., Baldani V.L.D., Seldin L., Dobereiner J.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – V. 36. – P. 86-93.

2. *Gmeiner J.* The ribitol-phosphate-containing lipopolysaccharide from *Proteus mirabilis*, strain D52 // Eur. J. Biochem. – 1977. – V. 74. – P. 171-180.

Velichko N.S.[1], Smolrkina O.N.[1], Dykman L.A.[1], Staroverov S.A.[1], Ignatov V.V.[1,2]

COMPOSITION PECULIARITIES AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* Z78 MEMEBRANE LIPOPOLYSACCHARIDE

[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, room105@ibppm.sgu.ru; [2]Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia,vvignatov@mail.ru

Summary. An LPS preparation from the outer membrane of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 was obtained by modified Galanos extraction. The total pool of the membrane LPS was found to contain mostly R-form molecules. The isolated preparation contained all characteristic LPS components, namely carbohydrates, KDO, heptoses, and the hydroxyalkane acids of lipid A. The polysaccharide portion of the LPS was found to be 80% 1,2,3,4-butanetetraol and 20% Rha, Man, Glc, Gal, GlcN, and GalN. Using a sheep phage antibody library, we obtained miniantibodies to LPS. The antigenic composition of the isolated LPS was investigated.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae* Z78, O antigen, miniantibodies.

УДК 612.015.38

Войтова Е.Е., Попов А.Д.

СОСТОЯНИЕ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У БЕРЕМЕННЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры "Ханты-Мансийская государственная медицинская академия", г. Ханты-Мансийск, Россия, popad@rambler.ru

Резюме. Изучено состояние адаптационных механизмов, колонизационной и неспецифической резистентности у 244 беременных с метаболическим синдромом. Обследование беременных включало оценку адаптационных реакций, исследование суточной экскреции катехоламинов, колонизационной и неспецифической резистентности. У обследованных пациенток в течение беременности выявлены разные адаптивные стратегии: чрезмерная и длительная симпато-адреналовая активация у женщин с метаболическими нарушениями в течение всей гестации, в контрольной группе менее выраженное напряжение адаптивных механизмов наблюдалось только в первом и третьем триместре. Дисбиотические состояния и диссонанс факторов неспецифической резистентности достоверно чаще регистрировался в основных группах.

Ключевые слова: адаптация, беременность, метаболический синдром, колонизационная резистентность.

Введение

Субарктические условия обитания человека вызывают значительное напряжение защитных механизмов, что способствует формированию "болезней адаптации" [1]. В популяции постоянно увеличивается количество молодых женщин с ожирением и дефицитом веса, которые сочетаются с нейрогенными расстройствами и сочетанными повреждениями эндокринных желёз, иммунодефицитными и дисбиотическими состояниями [2, 3]. В таких условиях качественные параметры адаптационных механизмов при беременности изменяются, а гестационные осложнения приобретают облигатный характер. Метаболический синдром - симптомокомплекс, определяющий высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний, включает абдоминальное ожирение, артериальную гипертензию, инсулинорезистентность и дислипидемию [4].

Наши представления по решению проблемы адаптации к беременности в условиях хронического заболевания и субарктических широт базируются на теории функциональных систем академика П.К. Анохина [5].

Цель работы – оценить состояние адаптационных механизмов, колонизационную и неспецифическую резистентности у женщин с метаболическим синдромом при беременности.

Материалы и методы исследования

Проводилась оценка вегетативного тонуса и реактивности, состояния естественной резистентности организма [2, 6, 7], определяли типы адаптационных реакций организма: тренировки (Т), активации (А), острого и хронического стресса (ОС, ХС). В конце второго триместра у 60 беременных женщин исследовали суточную экскрецию с мочой адреналина (АН), норадреналина (НА), дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дегидроксифенилэтиламина (ДОФамин). Активность сывороточного лизоцима, бета-лизинов определяли по методике О.В. Бухарина с соавт. [6]; альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина – методом В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной [8]. Качественный и количественный состав биоценозов оценивали по общепринятым методикам.

Механизмы адаптации изучали у 244 женщин основной группы в возрасте 17-41 года, из которых 154 имели избыточную массу тела, ИМТ= 31,12±0,40 кг/мI (1-я группа) и 90 – дефицит массы тела 18,96±0,12 кг/мI (2-я группа). Комплекс клинических и лабораторных показателей позволил выявить гипоталамическую природу изменения массы тела. Исследование имело лонгитудиальный открытый характер с параллельной оценкой тех же показателей у 107 беременных контрольной группы (из них у 36 пациенток проводилось проспективное, у 71 – ретроспективное исследование), имеющих ИМТ = 22,37±0,13 кг/мI. Однородность групп достигалась за счёт их одновременного формирования в одной и той же популяции, проживающей на определённой территории и сходства по ряду параметров (возраст, рост, паритет), за исключением проявлений заболевания (изменённая масса тела, вегетативная дистония, расстройства репродуктивной функции). Репрезентативность исследования основывалась на непреднамеренном отборе при помощи таблицы случайных чисел. Полученные результаты подвергнуты статистическому анализу с применением параметрических (критерий Стьюдента), непараметрических (критерий Фишера) методов. Расчёт проводился при помощи программы обработки электронных таблиц Microsoft Excel 7.0.

Результаты и обсуждение

Исследование вегетативного гомеостаза в контрольной группе выявило динамическое изменение показателей (табл. 1). Параметры лейкоцитарной формулы, отражающие реакцию тренировки и активации, выявлены у 63% беременных контрольной группы в первом триместре, 68% - во втором и 62% - в третьем триместре. Реакция острого и хронического стресса имела место у 37%, 32% и 38% пациенток соответственно.

Выявлено, что уровни катехоламинов и их предшественников в конце второго триместра у 15 беременных с нормальными ИМТ не отличались от параметров здоровых небеременных женщин [9], что свидетельствует о стабильности состояния и обычном напряжении механизмов адаптации (табл. 2). Величина среднего артериального давления (САД) составила в конце беременности – 85,7±1,01 мм рт. ст. ($p<0,001$ по сравнению с исходными показателями) и была наименьшей среди групп обследованных беременных (табл. 1). Содержание НА оказалось в 6 раз выше, чем у здоровых беременных ($p<0,001$). Отмечено 3-4-х кратное увеличение ДОФА у беременных основных клинических групп (табл. 2).

У беременных с изменённой массой тела в первом триместре преобладали стрессовые реакции – 69% (1) и 59% (2), причём на фоне гестоза имелся их рост к третьему триместру: 77% (1) и 88% (2), что достоверно выше, чем в контрольной группе ($p=0,025$). Состояние напряжения увеличивалось за счёт реакции ОС с 25% в обеих группах в 1-м триместре до 37% (1) и 47% (2) в конце беременности. В контрольной группе беременных преобладали реакции Т и А.

Исследование факторов неспецифической резистентности выявило различия в основной и контрольной группах (табл. 3).

Изменение состояния микробных экосистем имелось у 91% беременных основной группы и только у 33% пациенток контрольной группы ($p=0,025$). Характерным для микробного пейзажа кишечника было снижение уровня основных представителей флоры (лакто-, бифидо- и колибактерий) у 93% беременных с ожирением и 86% лиц с дефицитом массы тела. Наряду с этим у 26 (46%) беременных 1-й и 17 (55%) 2-й группы выявлена патогенная микрофлора (гемолизирующий стафилококк, гемолизирующая кишечная палочка, клебсиелла, дрожжеподобные грибы и т.д.), в то время как эти изменения зарегистрированы только у каждой десятой обследованной группы сравнения ($p>0,05$; $p<0,05$, соответственно). Вагинальный микробиоценоз был в пределах нормы у 34 (14%) беременных основных групп и 53 (58%) беременных группы контроля ($p=0,025$). Клинические и лабораторные признаки кольпита выявлены у 177 (73%) обследованных женщин с метаболическими нарушениями и 37 (40%) лиц контрольной группы ($p>0,05$). Рецидивирующее их течение было характерным в основной клинической группе. Чаще всего высевались грибы рода *Candida* – у 66 (28%) пациенток основной и у 19 (21%) беременных с нормальной массой тела ($p>0,05$). Посев мочи дополнил различия в микробной картине у обследованных: рост различных микробных ассоциаций зарегистрирован у каждой второй беременной основной группы (51%) и только у каждой четвёртой (24%) пациентки группы контроля.

Выводы

1. Адаптация женщин с метаболическим синдромом к беременности происходит за счёт чрезмерной симпато-адреналовой акти-

вации и преобладания реакций острого и хронического стресса, что является фактором риска развития гипертензивных форм гестоза.

2. Длительная и чрезмерная симпато-адреналовая активация у беременных основной группы сопровождалась дисбиотическим состоянием и диссонансом факторов неспецифической резистентности.

3. Женщины с метаболическим синдромом представляют собой группу риска по развитию тяжёлых гестационных и гнойно-септических осложнений, сердечно-сосудистой патологии, поэтому требуют проведения комплексных профилактических мероприятий в молодом возрасте.

Таблица 1.

Качественные параметры адаптации и среднее артериальное давление на этапах беременности у обследованных женщин

Группа	Триместр	Вегетативный тонус	Вегетативная реактивность (тип)	Преобладающий тип адаптационных реакций	САД (мм Hg)
Беременные с ожирением (n=99)	1	Симпатикотония	Симпатикотонический	ОС и ХС (69%)	94,21±1,29**
	2	Симпатикотония	Симпатикотонический	ОС и ХС (79%)	92,22±1,03**
	3	Симпатикотония	Симпатикотонический	ОС и ХС (79%)	96,44±1,02**
Беременные с дефицитом массы тела (n=51)	1	Умеренная симпатикотония	Симпатикотонический	ОС и ХС (59%)	80,8±1,43
	2	Умеренная симпатикотония	Симпатикотонический	ОС и ХС (83%)	85,24±1,5*
	3	Симпатикотония	Симпатикотонический	ОС и ХС (88%)	87,81±1,51
Беременные контрольной группы (n=78)	1	Умеренная симпатикотония	Асимпатикотонический	Т и А (63%)	79,8±0,92
	2	Нормотония	Асимпатикотонический	Т и А (68%)	79,°±0,84
	3	Умеренная симпатикотония	Симпатикотонический	Т и А (62%)	85,7±1,01

Примечание. *p<0,05, **p<0,001 по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2.

Суточная экскреция катехоламинов и их предшественников в конце второго триместра у обследованных беременных

Группа	Адреналин, нмоль/сут	Норадреналин, нмоль/сут	ДОФА, нмоль/сут	ДОФамин, нмоль/сут
Беременные с ожирением (n=30)	44,41±10,15*	275,29±69,8**	474,91±77,52**	1850,05±311,47
Беременные с дефицитом массы тела (n=15)	48,41±14,52*	276,59±88,3**	413,56±123,96**	4620,50±1276,58*
Беременные контрольной группы (n=15)	16,43±2,24	47,81±3,96	116,91±14,15	1987,29±167,74

Примечание. *p<0,05, **p<0,001 по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3.

Показатели неспецифической резистентности организма у обследованных женщин

№ группы	Триместр	Лизоцим, мкг/мл	β-лизины, %	α-1-антитрипсин, ИЕ/мл	α-2-макроглобулин, ИЕ/мл
1 (n=35)	1	14,97±1,40*	48,8±7,97	37,9±4,08**	2,33±0,48**
	2	14,31±1,67	50,94±4,54	44,62±4,06**	2,77±0,28**
	3	14,92±1,65	60,11±3,79*	45,93±3,92**	2,28±0,24**
2 (n=19)	1	11,16±1,57	47,89±8,56	38,25±3,35**	3,15±0,35*
	2	7,31±1,27**	51,25±6,59	40,1±3,23**	2,6±0,21**
	3	15,79±2,06	60,42±5,33*	46,0±4,63**	2,8±0,27**
3 (n=10)	1	9,78±2,14	56,7±6,23	28,42±1,19	4,31±0,33
	2	13,1±2,06	60,52±6,44	29,9±1,2	4,75±0,48
	3	14,48±1,44	73,92±5,17	31,23±1,0	5,14±0,55

Примечание. Условные обозначения: 1 группа - беременные с ожирением, 2 группа - беременные с дефицитом массы тела, 3 группа - беременные контрольной группы; *p<0,05, **p<0,001 по сравнению с контрольной группой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дильман В.М.* Эндокринологическая онкология (Руководство для врачей). – Л.:Медицина,1983. – 408 с.

2. *Баевский Р.М.*, *Берсенёва А.П.*, *Максимов А.В.* Валеология и проблема самоконтроля здоровья в экологии человека. – Магадан, 1996. – 56 с.

3. *Козлов А.И.*, *Вершубская Г.Г.* Медицинская антропология коренного населения Севера России. – М.: Изд-во МНЭПУ, 1999. – 288 с.

4. *Ротберг Г.Е.* Метаболический синдром. – М.: МЕД-пресс-информ, 2007. – 224 с.

5. *Анохин П.К.* Избранные труды: Кибернетика функциональных систем. – М.: Медицина, 1998. – 400 с.

6. *Гундаров И.А.*, *Матвеева С.В.* Недостаточная масса тела как фактор риска смерти от сердечно-сосудистых заболеваний // Тер. архив. – 2000. – № 1. – С. 72-74.

7. *Гаркави Л.Х.*, *Квакина Е.Б.*, *Уколова М.А.* Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов на Дону.: Изд-во Ростовского университета, 1990. – 224 с.

8. *Нартикова Ф.В.*, *Пасхина Т.С.* Унифицированный метод определения активности α-1-антитрипсина и α-2-макроглобулина в сыворотке крови человека. – Вопр. мед. химии. – 1979. – № 4. – С. 493-494.

9. *Пасман Н.М.* Клинико-морфологическая характеристика адаптационных реакций при беременности: Автореф. дис. … док. мед. наук. – Новосибирск, 1996. – 50 с.

Voitova E.E., *Popov A.D.*

NONSPECIFIC AND COLONIZATION RESISTANSE STATE OF PREGNANT WOMEN WITH METABOLIC SYNDROME

Khanty-Mansiysk State Medical Academy, Khanty-Mansiysk, Russia, popad@rambler.ru

Summary. The adaptive mechanisms condition and colonization resistance state of 244 pregnant women with metabolic syndrome were studied. The examination of pregnant women included the adaptive reactions' assessment, the study of diurnal excretion of catecholamines and nonspecific and colonization resistance. The examination of patients revealed different adaptive strategies: excessive and prolonged sympathoadrenal activation during the whole gestation period in cases of women with metabolic abnormalities, misbalance of a lesser degree was characteristic of only the first and the third trimesters in control. Disbiotic state and the discord of the nonspecific resistance factors were reliably more often registered in the main group.

Key words: adaptation, pregnancy, metabolic syndrome, colonization resistance.

УДК 615.076.7

Долгих Я.В., Несчисляев В.А., Белова И.В.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКОМПОНЕНТНЫХ ПРОБИОТИКОВ

Филиал Федерального государственного унитарного предприятия “Научно-производственное объединение “Микроген” Минздравсоцразвития России в г. Пермь “Пермское НПО “Биомед”, Пермь, Россия, neschislayew@gmail.com

Резюме. Проведено сравнительное изучение антагонистической активности известных зарубежных поликомпонентных пробиотиков и нового отечественного комплексного препарата пробиотиков. Антагонистические свойства исследовали с помощью теста ингибирования биолюминесценции. Выявлена высокая активность отечественного комплексного препарата бифилакт-БИЛС.

Ключевые слова: пробиотики, антагонистическая активность.

В современных условиях на фоне частого воздействия неблагоприятных экологических факторов и широкого распространения различных противомикробных препаратов дисбиотические нарушения носят массовый характер во всех слоях населения. Именно поэтому проблема разработки новых высокоэффективных пробиотиков является весьма актуальной.

В настоящее время на российском фармацевтическом рынке доминируют зарубежные пробиотические препараты, как правило, поликомпонентного состава. Многочисленные исследования и медицинская практика убедительно подтверждают наличие терапевтического эффекта у таких пробиотических микроорганизмов как *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. [1, 2].

Цель работы заключалась в сравнении антагонистической активности зарубежных препаратов и нового отечественного комплексного пробиотика. В качестве объектов исследования использовали коммерческие препараты: “Линекс” (“Фармацевтический и химический завод ЛЕК d.d.”, Словения), “Бифиформ” (“Ферросан А/с”, Дания) и препарат “Бифилакт-БИЛС”, разработанный “Пермским НПО “Биомед”. Определение антагонистической активности пробиотических комплексных препаратов в отношении энтеробактерий проводили с помощью экспресс-теста ингибирования биолюминесценции индикаторного штамма *Escherichia coli lum*$^+$C-50 [3, 4]. Подготовка к проведению измерений включала регидратацию и приготовление рабочего разведения индикаторного штамма люминесцирующих бактерий *E. coli lum*$^+$ с помощью очищенной воды с pH 7,0±0,2 и охлажденной до (6±2)°С. Затем жидкую индикаторную культуру выдерживали не менее 30 мин при температуре (22±2)°С. Препараты-пробиотики регидратировали 0,9%-м раствором натрия хлорида. При подготовке контрольной пробы к 0,5 мл индикаторной культуры добавляли 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. При подготовке опытной пробы 0,5 мл исследуемого препарата, разведенного в 10 раз, смешивали с 0,5 мл индикаторной культуры. Продолжительность совместной экспозиции исследуемого препарата и контрольного штамма составляла 24 ч при температуре (20±2) °С. Уровень гашения (стимуляции) свечения индикаторной культуры определяли через определенные промежутки времени (10 мин, 1, 2, 4, 6 и 24 ч) с помощью люминометра “Биотокс-10М” (ООО “НЕРА-С”, Россия). Индекс антагонистической активности (ИАА) препарата выражали в виде цифрового показателя, соответствующего проценту снижения интенсивности свечения индикаторного штамма.

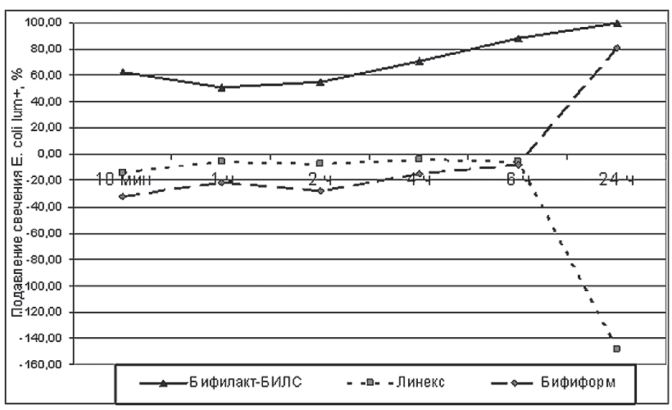


Рисунок. Влияние препаратов на биолюминесценцию *E. coli lum*$^+$

При проведении биолюминесцентного теста было выявлено несколько вариантов развития реакции ингибирования свечения индикаторного штамма *E. coli lum*$^+$ в смешанных с пробиотиками культурах (рисунок). “Бифилакт-БИЛС” с самого начала и до конца совместной экспозиции практически полностью подавлял биолюминесценцию сенсора. При использовании “Линекса” и “Бифиформа” при совместной экспозиции со штаммом *E. coli lum*$^+$ на протяжении первых часов экспозиции наступала фаза стимуляции свечения сенсора. При действии “Бифиформа” к 24 ч экспозиции развивается реакция полного подавления свечения, а “Линекс” – выраженное стимулирующее влияние.

Анализ динамики биолюминесценции тест-штамма в смешанных популяциях позволяет сделать вывод о его значительном адаптационном потенциале и о специфичности развития реакции ингибирования, обусловленной свойствами и составом пробиотика. Сопоставляя полученные результаты следует отметить наибольшую чувствительность тест-штамма к комплексному пробиотику “Бифилакт-БИЛС”. Поликомпонентный пробиотик “Бифиформ” по показателям антагонистической активности превосходит препарат “Линекс”.

Таким образом, импортные комплексные препараты “Линекс” и “Бифиформ” значительно уступают по показателю антагонистической активности новому отечественному комплексному пробиотику “Бифилакт-БИЛС”, выпуск которого должен обеспечить конкурентоспособность отечественной продукции на фармацевтическом рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунологические препараты и их перспективы применения в инфектологии / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, В.В. Поспеловой. М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ. – 2002. – 608 с.

2. *Салливан А., Норд К.* Место пробиотиков в терапии инфекций желудочно-кишечного тракта у человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т 5. – №. 3.– С. 275-284.

3. *Несчисляев В.А., Пшеничнов Р.А, Арчакова Е.Г.* и др. Способ определения антагонистической активности пробиотиков. Патент на изобретение № 2187801 от 20.08.2002 г. Заявка № 2000118391. Приоритет № 2000118391/14 от 14.07.2000 г. Бюл. № 23.

4. *Пшеничнов Р.А., Масленникова И.Л., Никитина Н.М.* Микробиолюминесценция (оптимизация сенсоров и расширение сферы использования реакции) / – Пермь: Перм. гос. техн. ун-т, 2005. – 76 с.

Dolgikh Ja.V., Neschislayev V.A., Belova I.V.

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF ULTICOMPONENT PROBIOTICS

“Biomed” – Perm Branch of the Federal State Unitary Company “Microgen” of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Perm, Russia, neschislayew@gmail.com

Summary. Comparative study of antagonistic activity of well-know foreign multicomponent probiotics and new native complex preparation was carried out. The antagonistic properties were assayed by the bioluminescence inhibition test. The investigation revealed high activity of native complex preparation bifilact-BILC.

Key words: probiotics, antagonistic activity.

УДК 577.152.193.01.

Заикина Е.А., Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г.

СИГНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В СИСТЕМЕ “РАСТЕНИЕ — ГРИБНОЙ ПАТОГЕН”

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, phyto@anrb.ru

Резюме. Подобраны праймеры и условия полимеразной цепной реакции для анализа экспрессионной активности гена анионной пероксидазы (АП) и оксалатоксидазы (ОхО) пшеницы под воздействием инфицирования *Septoria nodorum* Berk. и обработки сигнальными молекулами. Инфицирование *S. nodorum,* обработка салициловой и жасмоновой кислотами повышали экспрессию гена ОхО и АП в растительных тканях, что свидетельствует о вовлечении кодируемых ими ферментов в защитные реакции посредством регуляции уровня H_2O_2 в растительных тканях.

Ключевые слова: экспрессия генов, пероксидаза, оксалатоксидаза, АФК, устойчивость растений.

Введение

Важную роль во взаимоотношениях растений и патогенов играют активные формы кислорода (АФК), в том числе перекись водорода. В связи с открытием сигнальной и защитной роли H_2O_2 большое внимание уделяется оксидоредуктазам, регулирующим ее уровень в растительных тканях, в том числе оксалатоксидазы и пероксидазы. Сигнальными молекулами, механизм защитного действия которых связан с индукцией генерации АФК в растительных тканях, являются салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты. Предполагается, что салицилатный сигналинг влияет на устойчивость к биотрофам, а жасмонатный сигналинг определяет развитие устойчивости к некротрофам. Учитывая, что в природе широко распространены грибные патогены со смешанным (гемибиотрофным) типом питания, значительный интерес представляют исследования воздействия СК и ЖК на экспрессионную активность оксалатоксидазы и пероксидазы как регуляторов уровня H_2O_2, при инфицировании такими патогенами.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были использованы проростки пшеницы *T. aestivum* L. сорта Башкирская 24. Полностью развернутые листья 7- суточных проростков пшеницы срезали, помещали во влажную камеру на фильтровальную бумагу, срезы прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (40 мг/л). Отрезки листьев инокулировали суспензией пикноспор *S. nodorum* (10^6 спор/мл). СК и ЖК в концентрациях 0.05 мМ и 10^{-7} М использовали для замачивания семян пшеницы (3 часа).

ДНК из растений выделяли фенольно-детергентным методом. Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы согласно протоколу фирмы-поставщика. Для анализа экспрессии гена оксалатоксидазы (ОхО) были подобраны специфичные праймеры, фланкирующие консервативный участок гена, размером 420 п.н. и условия ПЦР. Данные амплификаты были просеквенированы. Выявлено, что они имеют схожесть на 98% с последовательностью из генбанка.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что в неинфицированных листьях пшеницы транскрипт не проявлялся, в то же время при инфицировании *S. nodorum*, обработке СК и ЖК экспрессия гена оксалатоксидазы усиливалась (рис. 1).

Причем, уровень экспрессии гена ОхО в инфицированных необработанных растениях был ниже, чем в предобработанных и инокулированных растениях пшеницы. ЖК оказывала более ранний индуцирующий эффект на экспрессию гена ОхО (12 ч после инфицирования) по сравнению с СК.

При проведении ПЦР с использованием праймеров к анионной пероксидазе накапливался амплификат, который соответствовал одному из консервативных участков гена анионной пероксидазы [1]. Любопытно, что в неинфицированных листьях пшеницы транскрипт проявлялся слабо, в то же время, при инфицировании экспрессия гена анионной пероксидазы через 12 ч после инокуляции усиливалась более чем в 1.5 раза (рис. 2). СК, в отличие от ЖК, оказывала более значительный индуцирующий эффект на экспрессию гена АП в инфицированных листьях на протяжении 24 ч.

Заключение

Таким образом, результаты исследований показали, что такие оксидоредуктазы, как оксалатоксидаза и анионная пероксидаза, кото-

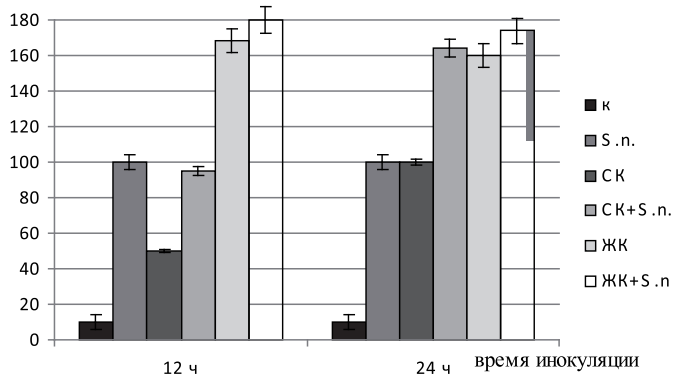


Рис.1 Влияние обработки салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами на уровень экспрессии гена ОхО в растениях пшеницы при инфицировании возбудителем септориоза.

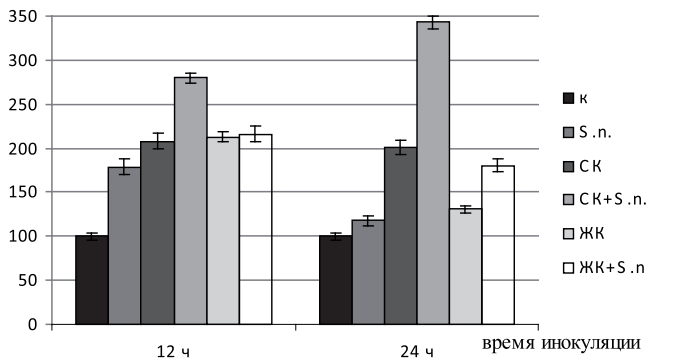


Рис.2 Влияние обработки салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами на уровень экспрессии гена АП в растениях пшеницы при инфицировании возбудителем септориоза.

рые наиболее интенсивно транскрибируются под влиянием сигнальных молекул, непосредственно принимают участие в защитных механизмах устойчивости растений пшеницы к возбудителю септориоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» №2.1.1./5676, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы ГК № 16.740.11.0061, «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», ГК № 16.512.11.2014, РФФИ (проект №11-04-97037 поволжье_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г., Максимов И.В.* Пути регуляции хитоолигосахаридами защитных реакций в растениях пшеницы при инфицировании *Bipolaris sorokiniana* // Физиология растений, 2007. – № 54. – С. 119–126.

Zaikina E.A., Burkhanova G.F., Yarullina L.G.

SIGNALING REGULATION OF OXIDOREDUCTASE GENE EXPRESSION IN “PLANT – PATHOGENIC FUNGI” SYSTEMS

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, phyto@anrb.ru

Summary. Primers and conditions were selected for the analysis of wheat anionic peroxidase and OxO gene expression activity under the infection with fungal pathogens and treatment with signaling molecules. Obtained

results revealed that infection with *S. nodorum* and treatment with salicylic and jasmonic acids increased OxO and anionic peroxidase gene expression in plant tissues, suggesting the involvement of their encoded enzymes in protective reactions by means of regulating the level of H_2O_2 in plant tissues.

Keywords: gene expression, peroxidase, oxalate oxidase, ROS, plant defense.

УДК 618.146-002-022

Зотова М.А., Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф., Орнер И.Ю., Батурина И.Л., Никушкина К.В.

ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

“Челябинская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Челябинск, Россия, www.chelsma.ru

Резюме. Среди факторов, способствующих формированию персистирующего течения папилломавирусной инфекции, рассматриваются вирусная нагрузка высокоонкогенных типов вируса папилломы человека и состояние локального иммунитета шейки матки. Целью работы стала оценка количественного содержания вируса папилломы человека высокого риска и интерферонов цервикальной слизи у ВПЧ-инфицированных женщин. По результатам исследования установлено, что группа женщин с транзиторной папилломавирусной инфекцией характеризовалась малозначимой вирусной нагрузкой и высокими уровнями интерферонов, в то время как персистирующее течение – повышенной концентрацией вируса и низким уровнем интеферона-α.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, персистенция, интерфероны, цервикальный секрет, шейка матки.

Введение

Персистенция вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого риска в цервикальных эпителиоцитах выступает в качестве серьезной предпосылки для развития неопластической и онкологической патологии шейки матки, что показано в ходе многочисленных исследований [1,2]. Течение и исход (элиминация или персистенция) любого инфекционного процесса представляет собой результат сложного характера взаимодействия вируса с его молекулярно-генетическими и функциональными свойствами, с одной стороны, и иммунной системой организма-хозяина с ее индивидуальными иммуногенетическими особенностями, с другой [3]. Благодаря совершенствованию молекулярно-биологических методов исследования стало возможным определение вирусной нагрузки высокоонкогенных типов ВПЧ высокого риска (точного количества копий ДНК вируса), которая рассматривается в качестве одного из факторов, влияющих на исход такого взаимодействия при папилломавирусной инфекции [4]. Наиболее быстрой ответной реакцией при встрече организма с вирусной инфекцией является продукция интерферонов, которые формируют защитный барьер на пути вирусов намного раньше специфических защитных реакций иммунитета [5]. В связи с этим, целью нашей работы стала оценка уровней вирусной нагрузки ВПЧ высокого риска и интерферонов цервикальной слизи у ВПЧ-инфицированных женщин.

Материалы и методы исследования

В исследование вошли 120 женщин с папилломавирусной инфекцией (ПВИ), которые ретроспективно были разделены на 2 группы: I группу составили 68 пациенток с отрицательными результатами ВПЧ-тестирования через 6 и 12 месяцев после первичного выявления ВПЧ высокого риска (транзиторное течение ПВИ), II группу – 52 женщины с положительным ВПЧ-тестом через 6 и 12 месяцев после первичного обследования (персистирующее течение ПВИ). Контрольную группу при иммунологическом исследовании составили 32 женщины с отрицательным ВПЧ-тестом, без клинико-морфологических изменений на шейке матки и иной гинекологической патологии. Для амплификации и количественного определения ДНК ВПЧ высокого риска 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов (без определения генотипа) в цервикальных соскобах методом ПЦР в режиме реального времени использовали набор реагентов “АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL” производства ФГУН “ЦНИИЭ” Роспотребнадзора (г. Москва). Результаты полученных концентраций ДНК ВПЧ высокого риска выражались в lg (ВПЧЧ10^5 клеток человека) и трактовались следующим образом: менее 3 lg – малозначимая, от 3 до 5 lg – значимая и более 5 lg – повышенная вирусная нагрузка. Количественное определение интерферонов (ИФН-α, ИФН-γ) в цервикальной слизи, проводилось методом ИФА с использованием тест-систем ООО “Цитокин” (г. Санкт-Петербург). Забор материала осуществляли в первую фазу менструального цикла до начала курса лечения. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Установлено, что средняя концентрация вируса в группе с транзиторным течением ПВИ составила 3,26±0,32 lg ВПЧЧ10^5 клеток. При персистирующем течении ПВИ вирусная нагрузка была достоверно выше относительно группы транзиторного течения инфекции (p=0,04) и определялась на уровне 4,28±0,33 lg ВПЧЧ10^5 клеток. Анализ распределения вирусной нагрузки показал, что у 41,2% женщин с транзиторным течением ПВИ обнаружена малозначимая нагрузка, в то время как значимая и повышенная концентрации ДНК ВПЧ высокого риска были выявлены в равном проценте случаев (29,4%). В группе с персистирующим течением ПВИ малозначимая вирусная нагрузка встречалась в 28,8% случаев, значимая – в 42,4%, повышенная – в 28,8%.

Результаты иммунологического исследования показали, что в цервикальной слизи женщин, у которых произошла элиминация вируса, концентрация ИФН-α составила 2382,95±372,14 пг/мл, концентрация ИФН-γ - 1166,29±100,03 пг/мл, что превышало аналогичные показатели у практически здоровых женщин (785,40±164,61 пг/мл и 803,50±65,66 пг/мл, p=0,01 и 0,02, соответственно). В то время как при персистирующем течении ПВИ уровень ИФН-α был сопоставим с контрольным значением (994,78±160,62 пг/мл) и был достоверно ниже по сравнению с транзиторной инфекцией (p=0,01).

Заключение

Таким образом, высокая антигенная нагрузка в сочетании с нарушением продукции ИФН-α цервикальной слизи является прогностически неблагоприятным признаком течения заболевания и способствует хронизации ВПЧ-инфекции репродуктивного тракта женщины. В то время как адекватная работа противовирусных факторов врожденного иммунитета в условиях низкой репликативной активности онкогенных типов ВПЧ способствует успешной элиминации вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koshiol J. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis // Am. J. Epidemiology. – 2008. – V. 168. N. 2. – P. 123–137.

2. Bhat P. Regulation of immune response to HPV-infection and during HPV-detected immunotherapy // Imm. Rev. – 2011. – V. 239. – P. 85–94.

3. Рязанцева Н.В. Цитокины и противовирусный иммунитет // Успехи физиологических наук. – 2006. – Т. 37. № 4. – С.34–44.

4. Вакцины для профилактики рака шейки матки / под ред. П.Л.Стерна, Г.С. Китченера; пер. с англ. под общ. ред. Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 192 с.

5. Young-Jin S. Type I interferon modulates the battle of host immune system against viruses // Adv. Appl. Microbiol. – 2010. – V. 73. – P. 83–101.

Zotova M.A., Abramovskikh O.S., Telesheva L.F., Orner I.Y., Baturina I.L., Nikushkina K.V.

PERSISTENCE FACTORS OF GENITAL HPV INFECTION

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia,

www.chelsma.ru

Summary. Among the factors contributing to the formation of persistent currents of human papillomavirus infection, viral load of human papilloma virus high-risk and the state of local immunity of the cervix are considered. The aim of the work was to assess the quantity of HPV high-risk in cervical mucus and levels of interferon in HPV-infected women. According to a study found that a group of women with transient HPV infection was characterized by meaningless viral load and high levels of the interferon, whereas the persistent current - high concentrations of virus and low INF-α level.

Key words: human papilloma virus, persistence, interferon, cervical secretions, cervix uteri.

УДК 579, 262

Иванова Е.В.[1,2], Перунова Н.Б.[1,2], Новикова И.В.[1], Ларина Т.П.[2]

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ СУПЕРНАТАНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, г. Оренбург, Россия, walerewna13@gmail.com; [2]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Оренбургская государственная медицинская академия", г. Оренбург, Россия

Резюме. *Цель.* Разработать метод определения антицитокиновой активности (АЦА) микроорганизмов, изучить распространенность и выраженность АЦА в отношении про- и противовоспалительных цитокинов у патогенных и условно-патогенных бактерий. *Материалы и методы.* Определена АЦА у 72 штаммов микроорганизмов, включая представителей кишечной микробиоты и штаммы патогенных бактерий (сальмонеллы и гонококки). Изучение способности супернатантов культур микроорганизмов вызывать изменение концентрации про- (ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-6) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) проводили путём соинкубирования экзометаболитов бактерий, грибов с рекомбинантными цитокинами. *Результаты.* Установлено, что АЦА в отношении про- и противовоспалительных цитокинов была выявлена у 50 – 62% исследуемых микроорганизмов. Снижение концентрации цитокинов в среде отмечено при соинкубировании их с супернатантами (в 56% случаев) исследуемых бактерий и грибов. Экспрессия антицитокиновой активности варьировала в зависимости от вида исследуемых микроорганизмов и была максимально выражена в отношении ФНО-α (*Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*), ИФН-γ (*N. gonorrhoeae* и *Salmonella enterica*) и ИЛ-10 (*Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.). *Заключение.* Полученные данные расширяют представления о модификации патогенными и условно-патогенными микроорганизмами цитокинов, что может влиять на течение и исход инфекционного процесса.

Ключевые слова: цитокины, кишечная микробиота, сальмонеллы, гонококки.

Введение

При рассмотрении инфекции как результата отношений паразит-хозяин очевидно, что инфекционный процесс – это модельная система ассоциативного симбиоза, где организм хозяина и его микрофлора образуют взаиморегулируемую систему [1], контролирующуюся посредством цитокиновой сети и определяющей направленность иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу [2]. Патогенные микроорганизмы, чтобы ослабить действие иммунной системы, могут модифицировать продукцию определенного вида цитокинов за счет стимуляции/супрессии их синтеза и использования определенных цитокинов в качестве ростовых факторов [3, 4]. Целью исследования явилась изучение распространенности и выраженности антицитокиновой активности в отношении про- и противовоспалительных цитокинов у патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая нормофлору толстого кишечника человека.

Материалы и методы исследования

Определена АЦА у 72 штаммов микроорганизмов, включая представителей кишечной микробиоты и штаммы патогенных бактерий (сальмонеллы и гонококки). Изучение способности супернатантов культур микроорганизмов вызывать изменение концентрации про- (ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-6) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) проводили путём соинкубирования экзометаболитов бактерий, грибов с рекомбинантными цитокинами.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования выявили наличие антицитокиновой активности у 58,1±11,9% исследуемых штаммов бактерий в отношении про- и противовоспалительных цитокинов. Высокие значения АЦА в отношении провоспалительного цитокина ФНО-α были характерны для доминантов – культур *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. и в среднем составляли 62±8,7%, 67±9,8% соответственно. Низкие значения данного свойства отмечены у экзометаболитов ассоциативных *Staphylococcus aureus* (28±6,1%) и *Klebsiella pneumoniae* (26±6,2%). Снижение концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 происходило под действием всех изученных ассоциантов (стафилококков и клебсиелл) ($p<0,05$), однако экспрессия данного признака в среднем составляла не более 19,5±4,1%. Супернатанты представителей нормальной микрофлоры (бифидобактерии и лактобациллы) обладали высоким уровнем экспрессии антицитокиновой активности в отношении противовоспалительного цитокина ИЛ-10 ($p<0,05$), которая в среднем составлял 70±9,6% и 35±5,1% соответственно. У исследуемых видов ассоциативных микроорганизмов обнаруживались более низкие значения АЦА в диапазоне 14–25%. Выраженность антицитокиновой активности в отношении ИФН-γ, играющего ключевую роль в клеточных механизмах иммунитета, имела высокие значения у экзометаболитов внутриклеточных патогенов *Neisseria gonorrhoeae* и *Salmonella enterica*, снижающих концентрацию ИНФ-γ в среднем на 34±5,1% и 51,5±8,2% соответственно.

Заключение

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о достаточно широком распространении АЦА среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, обуславливая адаптацию микросимбионтов в организме хозяина и участвуя в формировании иммунологической толерантности к индигенной микрофлоре посредством изменения концентрации цитокинов в микроокружении клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бухарин О.В.* Ассоциативный симбиоз. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
2. *Черешнев В.А.* Иммунология воспаления: роль цитокинов // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3. № 3. – С. 361–368.
3. *Horvat R.* Inactivation of human gamma interferon by *Pseudomonas aeruginosa* proteases: elastase augments the effects of alkaline protease despite the presence of α2-macrogkobukin // Infection and Immunity. – 1989. – V. 57. – P. 1668–1674.
4. *Leidal K.G.* Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade hyman RANTES, MCP-1, and ENA-78 // J. Interferon. Cytokine Res. – 2003. – V. 23. – P. 307–318.

Ivanova E.V.[1,2], Perunova N.B.[1,2], Novikova I.V.[1], Larina T.P.[2]

THE CHANGE IN THE CONCENTRATION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES RIGHTSUNDER THE INFLUENCE OF MICROORGANISMS SUPERNATANTS

[1]Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Orenburg, Russia, walerewna13@gmail.com; [2]Orenburg State Medical Academy, Orenburg, Russia

Summary. Develop a method for determining the anticytokine activity (ATSA) of microorganisms, examine the prevalence and severity of ATSA with regard to pro-and anti-inflammatory cytokines in pathogenic and opportunistic bacteria. Materials and methods. ATSA is defined in 72 strains of microorganisms, including representatives of the intestinal microbiota and the strains of pathogenic bacteria (*Salmonella* and *Gonococcus*). The study of the ability of supernatants and cells of living cultures of microorganisms to cause changes in the concentration pro-(IFN-γ, TNF-α, IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) was carried out by soinkubirovaniya exometabolites and living cells of bacteria, fungi, recombinant cytokines. Results. Established that the ATSA with regard to pro-and anti-inflammatory cytokines was detected in 50 - 62% of the investigated microorganisms. Reducing the concentration of cytokines in the medium was noted at soinkubirovanii them with supernatant (56%) and to a lesser extent - with the cells of living cultures (44%) studied bacteria and fungi. Expression of anticytokine activity varied depending on the study of microorganisms and was most pronounced for TNF-α (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*), IFN-γ (*N. gonorrhoeae* and *Salmonella enterica*) and IL-10 (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.). Conclusion. The data obtained extend the concept of modification of pathogenic and op-

portunistic microorganisms cytokines that can influence the course and outcome of infectious process.

Keywords: cytokines, the intestinal microbiota, salmonellae, gonococci.

УДК 615.327:553.74].015.4

Калина Н.Д., Чернышова Л.Е., Куранов Г.В., Хохрякова В.П.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА СЕРОВОДОРОДНОЙ МИНЕРАЛЬНОЙ ВОДЫ КУРОРТА “УСТЬ-КАЧКА”

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А.Вагнера” Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, rector@psma.ru

Резюме. В экспериментах на музейных культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и *Candida albicans* изучена антимикробная активность сероводородной минеральной воды. Выявлено снижение жизнеспособности бактерий и грибков в исследуемой воде, замедление скорости роста и повышение уровня чувствительности к антимикробным препаратам. Показано снижение гемолитической и лецитиназной активности у культур *S. aureus*. У пациентов с фарингитами и тонзиллитами после курса местной бальнеотерапии наблюдаются положительные изменения показателей микробной колонизации небных миндалин.

Ключевые слова: сероводородная минеральная вода, антимикробная активность.

Введение

Механизмы лечебного действия минеральных вод (МВ) весьма сложны и многогранны, однако, традиционно среди них не учитывается воздействие МВ на микрофлору. Между тем, угнетение бактерий под влиянием МВ, снижение выработки микробных факторов вирулентности имеет весьма важное клиническое значение. Цель исследования - оценка антимикробных свойств сероводородной минеральной воды курорта “Усть-Качка” в экспериментах *in vitro*, а также оценка динамики микробного пейзажа небных миндалин после местного лечения хронических фарингитов и тонзиллитов полосканиями данной минеральной водой.

Материалы и методы исследования

Сероводородная МВ курорта «Усть-Качка» имеет минерализацию 76 г/л и относится к рассольной хлоридной (Cl^- - 42129 мг/л) натриевой (Na^+ + K^+ - 26036 мг/л), крепкой сульфидной (H_2S + HS^-- 301 мг/л), содержащей бром (Br - до 58 мг/л) и бор в форме борной кислоты (H_3BO_3 до 360 мг/л). В экспериментах использовали разведения МВ, применяемые в бальнеологической практике, то есть содержащие 50, 100 или 150 мг/л сероводорода. Для полосканий применяли МВ с концентрацией сероводорода 50 мг/л.

В экспериментах использовали музейные микробные культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* CCM 1799 и *Candida albicans* ATCC 10231. Изучали выживаемость микробных культур в исследуемой МВ, влияние сероводородной МВ на скорость роста микробов на плотных средах, на уровень чувствительности к антибиотикам и на выраженность факторов вирулентности. Все эксперименты выполняли в трех повторностях с использованием известных методик. Влияние МВ на уровень антибиотикочувствительности выражали как отношение диаметра зоны угнетения роста в опыте к аналогичному показателю в контроле, обозначая этот показатель как коэффициент влияния. При изучении влияния на гемолитическую и лецитовителлазную активность вычисляли индекс активности, то есть отношение диаметра зоны гемолиза или «радужки» к диаметру колонии. В качестве контроля использовали физиологический раствор.

Обследовано 50 пациентов, у которых в комплекс лечебно-оздоровительных мероприятий были включены полоскания сероводородной водой (ежедневное одноразовое полоскание ротоглотки 10 минут на протяжении 10 дней). Проведены повторные микробиологические исследования мазков с поверхности небных миндалин: до курса лечения и после его завершения. Выделение и идентификацию микробных культур проводили по методикам, регламентированным Приказом МЗ № 535.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев Стьюдента и Уилкоксона при помощи компьютерной программы «Биостат». При проверке статистических гипотез критический уровень значимости принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Выживаемость бактериальных и грибковых культур во все сроки пребывания в МВ, начиная с 1-го часа, была существенно ниже, чем в контроле. Диаметр колоний на плотных средах после контакта культур с МВ также оказался ниже контрольных показателей (табл. 1).

Таблица 1.

Диаметр колоний микроорганизмов на плотной среде, мм (M ± m)

	S. aureus ATCC 292133	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*Pr. vulgaris* CCM 1799	*C. albicans* ATCC 10231
Опыт	1,65±0,02*	2,15±0,03*	2,65±0,02*	2,70±0,03*	1,89±0,04*
Контроль	1,84±0,02	2,40±0,03	2,86±0,05	2,99±0,03	2,11±0,03

Примечание. *Различия опыт/контроль статистически значимы по критериям Стьюдента и Уилкоксона ($p < 0,05$).

Индекс гемолитической и лецитовителлазной активности *S. aureus* после контакта с МВ был существенно ниже, чем в контроле: 1,22 против 1,34 для гемолизина, 1,05 против 2,03 для лецитовителлазы. Уровень антибиотикочувствительности микробов под влиянием сероводородной МВ повышался (табл. 2). Повышение антибиотикочувствительности культур не зависело от строения микробной клетки или механизма влияния препарата, что свидетельствует об универсальности процесса воздействия данной МВ на микроорганизмы.

Микробиологические исследования, проведенные при поступлении, выявили высокую частоту и степень колонизации миндалин золотистым стафилококком, β-гемолитическими стрептококками и грибками *Candida albicans*.

Таблица 2.

Влияние сероводородной МВ на уровень чувствительности микробных культур к антибиотикам, средний диаметр зоны угнетения роста, мм (M + m)

Культуры	Препараты	Средние показатели		Уровень значимости различий	Коэффициент влияния
		Опыт	Контроль		
E. coli	Ампициллин	23,67±0,88	20,33±0,33	0,028	1,16
	Цефотаксим	42,67±0,33	39,00±0,48	0,008	1,10
	Гентамицин	25,33±0,33	21,67±0,33	0,008	1,17
	Ципрофлоксацин	49,67±1,20	40,67±0,33	0,028	1,22
C. albicans	Амфотерицин	16,00±0,58	12,67±0,33	0,01	1,26
	Нистатин	17,00±0,58	13,67±0,3	0,038	1,24
	Итраконазол	12,33±0,33	8,00±1,16	0,039	1,54
	Клотримазол	25,33±0,33	21,00±0,58	0,006	1,21

Повторные микробиологические исследования выявили в 70% случаев либо существенное снижение, либо исчезновение присутствовавших исходно патогенов (*S. aureus*, дрожжеподобных грибков или энтеробактерий), а у остальных пациентов сохранялась исходная структура микрофлоры небных миндалин.

Заключение

Выявленные в экспериментах антимикробные эффекты сероводородной МВ позволяют с новых позиций оценивать полученные клинические и микробиологические результаты бальнеотерапии, а также открывают перспективы более глубокого изуче-

ния механизмов лечебного действия МВ.

Kalina N.D., Chernyshova L.E., Kuranov G.V., Khokhryakova V.P.

ANTIMICROBIC PROPERTIES OF HYDROSULPHURIC MINERAL WATER OF HEALTH RESORT "UST-KACHKA"

Academician E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, rector@psma.ru

Summary. Antimicrobial activity of hydrosulfuric mineral water was investigated in experiments on museum cultures *S.aureus, E.coli, P.vulgaris* and *C. albicans*. Lowering of bacterial and fungous viability in the investigated water, retardation of growth rate and heightening of sensitivity to antimicrobial preparations was revealed. Reduction of hemolytic and lecithinase activity in *S.aureus* cultures was shown. In patients with pharyngites and tonsillites positive changes in microbial colonization of palatine tonsils after local balneotherapy course were observed.

Key words: hydrosulphuric mineral water, antimicrobial activity.

УДК 579.61; 571.27; 57.083

Каримов И.Ф., Качкова Д.Н.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ БАКТЕРИЦИДНЫХ ФАКТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ИММУНИТЕТА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Оренбургский государственный университет", г. Оренбург, Россия, ifkarimov@yandex.ru

Резюме. Разработаны инновационные биолюминесцентные технологии, предназначенные для оценки активности молекулярных и клеточных факторов естественного иммунитета человека и животных при проведении лабораторных диагностических исследований. Основными преимуществами предложенного подхода являются возможность экспрессной и дифференцированной оценки бактерицидных систем сыворотки крови, а также кислородного метаболизма нейтрофилов и моноцитов при фагоцитозе с достижением названных задач на единой технологической платформе.

Ключевые слова: биолюминесценция, бактерицидность, естественный иммунитет.

Исследование и оценка бактерицидных систем человека и животных, формирующих систему их неспецифического врожденного иммунитета, остается одной из важных задач современной биологии и медицины [1]. Однако методы их исследования, в своем большинстве разработанные в 60-70-х годах XX века, вследствие своей высокой длительности и трудоемкости не отвечают требованиям, предъявляемым к современным лабораторным технологиям.

Одним из возможных решений данной проблемы может стать использование методов биолюминесцентного анализа, основанных на регистрации светового сигнала (люминесценции), возникающего в результате протекания специфических химических реакций в биологических системах и получающих все большее распространение в различных приложениях наук о жизни [2]. При этом важными преимуществами методов биолюминесцентного анализа являются их высокая чувствительность и быстродействие, позволяющие в режиме реального времени получать информацию о функциональном состоянии (жизнеспособности) бактериальных клеток-мишеней при контакте с факторами естественного иммунитета [3], а также оценивать в них уровень экспрессии вовлеченных в данные процессы стрессовых генов [4].

При проведении исследований в данном направлении установлено, что дифференцированная оценка молекулярных бактерицидных систем сыворотки крови возможна с использованием люминесцирующих бактерий с различным типом строения клеточной стенки, определяющим их селективную чувствительность к названным факторам. В частности, при изучении чувствительности и специфичности люминесцентного отклика рекомбинантных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* с клонированными *luxCD(AB)E*-генами природного люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium leiognathi* на воздействие индивидуальных образцов сыворотки крови человека различного компонентного состава продемонстрировано соответствие уровня остаточной биолюминесценции и выраженности развивающегося в подобных условиях бактерицидного эффекта, а также связь подавления свечения *E. coli lux*$^+$ с активностью системы комплемента и лизоцима при преимущественной зависимости реакции *B. subtilis lux*$^+$ на присутствие в сыворотке крови бета-лизина (системы тромбоцитарных катионных белков).

Распространение данного подхода для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови человека с использованием рекомбинантного штамма *E. coli lux*$^+$ потребовало разработки особой процедуры его опсонизации, исключающей не связанные с фагоцитозом киллинговые эффекты, одновременно подтвердив пропорциональность между остаточным уровнем биолюминесценции и жизнеспособностью бактериальных клеток-мишеней. В свою очередь, выявление неидентичности спектров люминолзависимой хемилюминесценции лейкоцитов, формирующейся при активации их кислородзависимых бактерицидных систем, и биолюминесценции бактериальных клеток-мишеней явилось условием для одновременной раздельной оценки данных типов свечения в одной пробе в двух спектральных диапазонах [5].

Иная возможность дифференцированной оценки кислородзависимых бактерицидных систем нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека связана с использованием в качестве объектов для фагоцитоза люминесцирующих штаммов *E. coli*, несущих генетические конструкции *soxS'::lux* и *katG'::lux*, относительно специфично реагирующие развитием свечения в присутствии супероксиданиона и перекиси водорода. Проведение подобных исследований позволило констатировать преимущественную индукцию генетической конструкции *soxS'::lux* при контакте с моноцитами, а *katG'::lux* с нейтрофилами, что может определяться различиями в спектрах образуемых ими активных метаболитов кислорода. В дополнение к этому выявлен факт индукции люминесценции репортерного штамма *E. coli recA'::lux*, свидетельствующий об активации SOS-ответа данного микроорганизма как следствия повреждения его ДНК генерируемыми при фагоцитозе активными формами кислорода.

Полученные результаты позволили определить оптимальный состав панели бактериальных люминесцирующих биосенсоров для количественной оценки основных гуморальных и клеточных бактерицидных систем человека и животных. При этом единым принципом реализуемых с их использованием лабораторных технологий является количественная оценка подавления или индукции свечения бактериальных клеток-мишеней в присутствии исследуемых факторов, а требования к составу данной панели определяются наличием рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов, особенности строения поверхностных структур или генетической организации каждого из которых позволяет специфично оценивать состоятельность определенной бактерицидной системы.

Исследования выполнены при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (контракт № П327) и гранта РФФИ (проект № 11-04-97064-р_поволжье_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gura T.* Innate immunity: ancient system gets new respect // Science. – 2001. – V. 291. N. 5511. – P.2068–2070.

2. *Дерябин Д.Г.* Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Наука. – 2009. – 246 с.

3. *Nypaver C.M., Thornton M.M., Yin S.M., Bracho D.O., Nelson P.W., Jones A.E., Bortz D.M., Younger J.G.* Dynamics of human complement-mediated killing of *Klebsiella pneumoniae* // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2010. – V. 43. N. 5. – P.585–590.

4. *Francis K.P., Gallagher M.P.* Light emission from a Mudlux transcriptional fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by hydrogen peroxide and by interaction with the mouse macrophage cell line J774.2 // Infect Immun. – 1993. – V. 61. – P. 640–649.

5. *Дерябин Д.Г., Каримов И.Ф.* Возможность одновременной оценки хемилюминесценции и биолюминесценции в фагоцитарной системе // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т.147. № 3. – С. 322–327.

Karimov I.F., Kachkova D.N.

BIOLUMINESCENT TECHNOLOGIES OF DETECTING MOLECULAR AND CELLULAR BACTERICIDAL FACTORS OF INNATE IMMUNITY

Orenburg State University, Orenburg, Russia,
ifkarimov@yandex.ru

Summary. Innovative bioluminescent technologies for laboratory diagnostic researches, based on a quantitative estimation of molecular and cellular factors of natural immunity of the human and animals are developed. The main advantage of proposed approach is the capability of express and differential estimation of serum blood bactericidal systems and neutrophil and monocyte oxygen metabolism under the phagocytosis with the achievement of indicated problems using uniform technological platform.

Key-words: bioluminescence, bactericidal action, innate immunity.

УДК 579.26

Кирьянова И.Н.[1], Баландина С.Ю.[1], Крылова И.О.[1,2], Четина О.А.[1], Александрова Г.А.[1]

О ПРОБЛЕМЕ ПЛЕСНЕВОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ЖИЛЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ГОРОДА ПЕРМИ

[1] Естественнонаучный институт Пермского государственного национального исследовательского университета, г. Пермь, Россия, bactericid@ya.ru; [2] Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет", г. Пермь, Россия, lymar11@rambler.ru

Резюме. Исследовано более 100 жилых помещений г. Перми. Доминирующими представителями являются грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Cladosporium*, из других выделены рода *Alternaria, Mucor, Fusarium, Stachybotrys, Trichoderma*. К токсинообразованию способны следующие виды: *A. flavus*, *A. cervinus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. wentii* – афлатоксины; *P. camembertii*, *P. citrinum*, *P. hirsutum* – цитринин; у представителей родов *Alternaria* и *Cladosporium* – токсинообразующих свойств не обнаружено.

Ключевые слова: плесневые грибы, микотоксины, жилые помещения, риски для здоровья.

Введение

Известно, что человек живет не в стерильных условиях, воздушная среда изобилует микроорганизмами, в том числе спорами плесневых грибов. Их содержание в количестве 100,0-500,0 КОЕ/м^3 во внутренней среде жилых и общественных помещений, по Европейскому проекту ECA COST 613 199300 характеризуется как средний уровень контаминации воздуха, а 500,0-2 000,0 КОЕ/м^3 и выше – как высокий и очень высокий. По данным ВОЗ (1990), пороговой концентрацией спор в воздухе помещений предложено считать 500,0 КОЕ в 1 м^3 воздуха [1, 2]. Но при возникновении благоприятных условий, основными из которых является повышенная влажность и оптимальная для роста грибов температура, отсутствие активного проветривания, начинается прорастание спор, развитие мицелия [3]. К основным источникам спор плесневых грибов в жилых помещениях следует отнести: наружный атмосферный воздух, строительные и отделочные материалы, протечки, нарушение микроклимата, земля в цветочных горшках, испорченные пищевые продукты, домашняя пыль; часть спор приносится на одежде и обуви, на шерсти домашних животных. Одной из причин появления очагов плесневого загрязнения является также неправильная установка пластиковых окон.

При активном росте и развитии плесневых грибов образуется большое количество спор, микроскопический размер которых (от 1 мкм до 8 мкм) позволяет им быстро и легко разноситься током воздуха и достигать носовой полости и альвеол легких человека [4]. Впоследствии это может привести к аллергическим проявлениям и микозам внутренних органов. Имеет значение и выделение плесневыми микромицетами низкомолекулярных ядовитых вторичных метаболитов – микотоксинов, которые оказывают специфическое патологическое влияние на живой организм. Среди микотоксинов своими токсическими свойствами (мутагенность, тератогенность, канцерогенность) и широким распространением выделяются афлатоксины, охратоксины, трихотеценовые микотоксины, зеараленон, цитринин и патулин, хотя потенциально опасными для человека являются и многие другие микотоксины [5]. По данным Айме Муст (Aime Must, 1996) и его коллег, некоторые микотоксины могут присутствовать в воздухе и накапливаться во влажных гипсокартонных панелях, больше всего токсинов обнаружено по краям вентиляционных отверстий и плинтусов.

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы явилось исследование жилых помещений г. Перми на предмет выявления грибковой контаминации. Было исследовано более 100 жилых помещений г. Перми с видимыми биоповреждениями и без биоповреждений. Методика исследований включала визуальное обследование жилых помещений, отбор проб и исследование их на контаминацию микромицетами, определение общего количества микроорганизмов с последующей идентификацией до рода и вида.

Результаты и обсуждение

Микробиологический анализ данных показал, что в воздухе помещений без биоповреждений количество жизнеспособных спор плесневых грибов составляет в среднем 449,2 КОЕ/м^3. В помещениях с видимым поражением материалов биологическими агентами, протечками, слабой вентиляцией и повышенной влажностью содержание общего количества микомицетов возрастает в среднем до 1 943,5 КОЕ/м^3, что указывает на высокий уровень микогенной контаминации воздуха.

В процентном соотношении на первом месте как в воздухе, так и в строительно-отделочных материалах можно выделить 3 основных рода грибов: *Penicillium* (24,4% и 26,57% соответственно), *Aspergillus* (21,60% и 19,58%), и *Cladosporium* (13,60% и 17,48%). В меньшей степени встречались плесневые грибы родов: *Alternaria* (5,64% и 14,69%), *Mucor* (10,33% и 9,09%), *Fusarium* (4,69% и 0,70%), *Stachybotris* (2,36% и 0,70%), *Trichoderma* (1,89% и 0,00%). Наряду с плесневыми микомицетами, отмечено загрязнение образцов стройматериалов дрожжеподобными грибами (от 3 000,00 до 38,41 млн. КОЕ/г), что может свидетельствовать о несоблюдении санитарно-гигиенического режима в помещении и способствовать более интенсивному развитию плесневой микрофлоры. Кроме того, они были обнаружены в чистых обоях (7 351,00 КОЕ/г) и воздухе (от 11,00 до 92,00 КОЕ/м^3).

Для исследования способности к токсинообразованию отобраны самые распространенные рода плесневых грибов, которые могут представлять опасность для здоровья. Исследования показали, что к токсинообразованию способны следующие выделенные нами виды: род *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. cervinus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. wentii*) – афлатоксины; род *Penicillium* (*P. camembertii*, *P. citrinum*, *P. hirsutum*) – цитринин. У родов *Alternaria* (*Al. longipes*, *Al. oleracea*, *Al. tenuissima*) и *Cladosporium* (*Cl. elegantulum*, *Cl. sphaerospermum*) токсинообразующих свойств не обнаружено.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее частыми обитателями загрязненных помещений г. Перми являются микроскопические грибы рода *Penicillium* (25 видов), *Aspergillus* (11 видов), *Cladosporium* (4 вида), в меньшей степени встречаются рода *Alternaria* (4 вида), *Mucor*, *Fusarium*, *Stachybotrys, Trichoderma* (по 1 виду). Обнаружено также, что представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* чаще встречаются в образцах обоях и штукатурке, родов *Alternaria, Fusarium, Stachybotrys, Trichoderma* – в обоях и других целлюлозосодержащих материалах, рода *Mucor* – в образцах штукатурки и побелки. 6 видов из рода *Aspergillus*, 3 вида из рода *Penicillium* обладали токсинообразующими свойствам. Большинство из них относятся к 3-4 группе патогенности (СП 1.3.2322-08), что подтверждалось активным их ростом при температуре +37°С.

Таким образом, длительное пребывание людей в исследованных помещениях, содержащих большое количество плесневых грибов, а особенно в помещениях с видимыми признаками биоповреждений, опасно для здоровья человека, является фактором риска и может сопровождаться появлением аллергии, дерматитов, астмы, усугублением хронических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Желтикова Т.М. К вопросу о допустимом уровне микромицетов в воздухе помещений // Проблемы медицинской микологии, 2009. – Т11. – N.2. – С 41–42.

2. WHO. Indoor air quality: biological contaminants. Report on a WHO meeting. Copenhagen: WHO Regional publications, 1990. – N.31. – P.1–67. (www.euro.who.int).

3. Билай В.И. Основы общей микологии. – Киев: Выща шк., 1989. – 392 с.

4. Митрофанов В.С., Свирщевская Е.В. Аспергиллез легких. – СПб.: Фолиант, 2005. – 144 с.

5. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (Медицинские и биологические аспекты). – М.: Медицина, 1985. – 320 с.

Kiryanova I.N.[1], Balandina S.Ju.[1], Krylova I.O.[1,2], Chetina O.A.[1,2], G.A. Aleksandrova[1]

THE PROBLEM OF MOULD CONTAMINATION IN PERM LIVING QUARTERS

[1]Natural Sciences Institute of Perm State National Research University, Russia, Perm, bactericid@ya.ru; [2]Perm State National Research University, Russia, Perm, lymar11@rambler.ru

Summary. Over 100 living quarters were investigated in the city of Perm. Dominating representatives were moulds of genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, and of other genera there were isolated *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*. Of these some species were able to generate toxins: *A. flavus*, *A. cervinus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. wentii* – aflatoxins; *P. camembertii*, *P. citrinum*, *P. hirsutum* – citrinin, while the ability to produce toxins was not observed in representatives of genera *Alternaria* and *Cladosporium*.

Key words: moulds, mycotoxins, living quarters, health risks.

УДК 615.4:615.33:663.1

Крылова Т.В., Несчисляев В.А., Чистохина Л.П.

К ВОПРОСУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ

Филиал Федерального государственного унитарного предприятия “Научно-производственное объединение “Микроген” Минздравсоцразвития России в г. Пермь “Пермское Научно-производственное объединение “Биомед”, Пермь, Россия, neschislayew@gmail.com

Резюме. Изучена антимикробная активность метаболитных комплексов бактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* 1 биолюминесцентным методом. Исследования показали, что низкомолекулярная (менее 15 кДа) фракция метаболитов оказывает наибольшее антибактериальное действие.

Ключевые слова: метаболиты, пробиотики, биолюминесценция.

Важнейшими представителями резидентной микрофлоры человека всех возрастов являются бифидобактерии, присутствующие в кишечнике на протяжении всей жизни здорового индивидуума и играющие существенную роль в обеспечении состояния физиологической нормы. Бифидофлора оказывает разностороннее положительное влияние на макроорганизм за счет продукции биологически активных метаболитов, которые стимулируют рост индигенной микрофлоры, оказывают иммуномодулирующее влияние, являются репарантами слизистых оболочек, активно участвуют в обмене веществ и т.д. Выраженное антимикробное действие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы оказывают кислоты, лизоцим и антибиотикоподобные пептиды, продуцируемые бифидобактериями [1]. Поэтому представляет большой интерес выделение метаболитных фракций из культуральной жидкости пробиотических штаммов бифидобактерий и разработка на их основе препаратов для лечения и профилактики кишечных инфекций.

Цель работы заключалась в сравнительном исследовании антимикробной активности метаболитных комплексов, выделенных из культуральной жидкости производственного пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* 1 ультрафильтрацией на разделительных аппаратах с полыми волокнами с пределом задержания по молекулярной массе (ПЗММ) 15, 100 и 300 кДа. Антимикробную активность в отношении энтеробактерий определяли в тесте ингибирования биолюминесценции индикаторного штамма *Escherichia coli lum*$^+$ [2, 3]. Лиофильно высушенную культуру тест-штамма регидратировали 0,9% раствором натрия хлорида, охлажденным до 4-8°С, в течение 30 мин при температуре (6±2)°С. Затем бактериальную взвесь *E. coli lum*$^+$ разводили 0,9% раствором натрия хлорида до рабочей концентрации клеток и выдерживали не менее 30 мин при температуре (22±2)°С. 0,5 мл полученной тест-культуры смешивали с 0,5 мл ультрафильтрата (цельного или разведенного 0,9% раствором натрия хлорида в 2 раза) и выдерживали при температуре (22±2)°С. В ходе опытов регистрировали динамику интенсивности биолюминесценции бактерий *E. coli lum*$^+$ в пробах с помощью люминометра “Биотокс-10М” (ООО “HEPA-C”, Россия). Относительную степень изменения интенсивности биолюминесценции опытной пробы по сравнению с контрольной выражали количественно в виде индекса антибактериальной активности (ИАА) по формуле: ИАА = $(I_к - I_о)/I_к$x100%, где $I_к$ - интенсивность биолюминесценции контрольной пробы (без ультрафильтрта), $I_о$ - интенсивность биолюминесценции опытной пробы (с ультрафильтратом). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стъюдента [4]. Результаты в таблице представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки (M±m).

Таблица.

Сравнительная характеристика ИАА ультрафильтратов *B. bifidum* 1

ИАА, %				
ПЗММ		15 кДа	100 кДа	300 кДа
Цельный ультрафильтрат				
Время экспозиции, мин	5	96,56±0,08	93,94±0,09	96,05±0,08
	60	95,57±0,05	95,83±0,08	98,25±0,01
	120	96,17±0,02	95,51±0,08	96,77±0,06
Ультрафильтрат, разведенный в 2 раза				
Время экспозиции, мин	5	91,56±0,20	76,43±0,49*	73,43±0,41*
	60	82,37±0,18	77,63±0,24*	67,82±0,31*
	120	83,83±0,10	72,20±0,06*	68,68±0,09*

Примечание: * - $p<0,001$ по *t*-критерию Стьюдента в сравнении с 15 кДа.

Исследования показали, что цельные ультрафильтраты быстро (уже через 5 мин совместной экспозиции) и значительно (более чем на 90%) ингибируют биолюминесценцию тест-штамма. Разведение ультрафильтратов в 2 раза позволило выявить достоверные отличия их антибактериальной активности. Метаболитная фракция *B. bifidum* 1, полученная на разделительном аппарате с полыми волокнами с пределом задержания по молекулярной массе 15 кДа, в большей степени угнетает свечение *E. coli lum*$^+$ по сравнению с фракциями 100 и 300 кДа. Вероятно, высокомолекулярные компоненты, присутствующие в метаболитных фракциях 100 и 300 кДа, нивелируют антимикробное действие ультрафильтрата. Данный эффект требует дальнейшего исследования в других моделях экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА
1. *Шендеров Б.А.* Медицинская и микробная экология и функциональное питание: В 3 т. Т. I: Микрофлора человека и животных и ее функции. – М.: "ГРАНТЪ", 1998. – 288 с.
2. *Несчисляев В.А. и др.* Способ определения антагонистической активности пробиотиков. Патент России №2187801. Заяв. 10.07.2000. Опубл. 20.08.2002. Бюл. №23.
3. *Пшеничнов Р.А., Масленникова И.Л., Никитина Н.М.* Микробиолюминесценция (оптимизация сенсоров и расширение сферы использования реакции) – Пермь: Перм. гос. техн. ун-т., 2005. – 76 с.
4. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. - М.: Практика, 1999. – 459 с.

Krylova T.V., Neschislayew V.A., Chistokhina L.P.

REVISITED DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROBIOTIC STRAIN METABOLITES

"Biomed" - Perm Branch of Federal State Unitary Company "Microgen" of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Perm, Russia, neschislayew@gmail.com

Abstract. Antimicrobial activity of metabolite bacterial complexes of strain *Bifidobacterium bifidum* 1 was investigated by the bioluminescence method. It was shown that low molecular (less than 15 kDa) faction of metabolites possessed highest antimicrobial activity.
Key words: metabolites, probiotics, bioluminescence.

УДК 579.61

Литвинов В.В.[1], Лемкина Л.М.[2], Фрейнд Г.Г.[1], Коробов В.П.[2]

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ МОДЕЛИ КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ БИОПЛЕНКАМИ СТАФИЛОКОККОВ

[1]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера", г. Пермь, Россия; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, drlitvinov@ mail.ru

Резюме. Проведено моделирование катетер-ассоциированной инфекции у лабораторных животных для изучения морфологических реакций тканей вокруг катетеров. Предварительно *in vitro* исследовали интенсивность образования биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis* 33 на различных медицинских катетерах. В экспериментах *in vivo* на лабораторных мышах использовали катетеры фирмы Apexmed International, на которых образование бактериальных пленок было наиболее выраженным. Установлено, что подкожное введение оккупированных биопленками фрагментов катетеров приводит к воспалительной реакции окружающих тканей, более выраженной по сравнению с подкожным введением взвеси стафилококков в зону имплантации стерильных катетеров. Использованная модель катетер-ассоциированной инфекции может быть реализована для оценки эффективности влияния различных антибактериальных соединений на биопленки *in vivo*.
Ключевые слова: модель катетер-ассоциированной инфекции, биопленки, морфология тканей.

Введение

Широкое внедрение в медицинскую практику методов интенсивной и инвазивной терапии, неразрывно связанное с необходимостью катетеризации сосудов, осложняется формированием бактериальных пленок – прикрепленных к поверхностям медицинских устройств микробных сообществ, в которых бактериальные клетки заключены в матрицу внеклеточных полимерных субстанций, продуцируемых микроорганизмами в соответствии с уровнем развития популяции и транскрипции специфических генов [1–2]. Это ведет к увеличению числа случаев т.н. катетер-ассоциированных инфекций (КАИ), составляющих более 60% госпитальных бактериемий в европейских странах и 11–37% всех нозокомиальных инфекций. Риск возникновения КАИ частично определяется типом используемого биоматериала и характером поверхности катетера, его протяженностью и длительностью применения. Связь сепсиса с инфицированным катетером по разным источникам составляет от 20–29 до 55% [3–5].

На протяжении многих лет стафилококки остаются одними из основных возбудителей широкого спектра заболеваний человека – от легких пиодермий до тяжелых гнойно-септических состояний, в том числе и КАИ, большая часть которых обусловлена развитием биопленок золотистых или эпидермальных стафилококков. Разработка методов предупреждения формирования и борьбы с функционирующими бактериальными пленками может быть основана на использовании адекватных моделей таких патологических состояний. Целью настоящей работы являлось создание модели катетер-ассоциированной инфекции у лабораторных животных с изучением морфологических реакций тканей вокруг катетеров.

Материалы и методы исследования

В предварительных экспериментах была оценена интенсивность пленкообразования бактериями *Staphylococcus epidermidis* 33 на катетерах Peutaferte-Teramo (Италия), Capitole sanitex (Швейцария), Apexmed International (Нидерланды), KDM KD-FLY (Германия) и Ситек-сервис» (Россия). Нарезанные фрагменты катетеров (1 см) были помещены в отдельные стеклянные флаконы и стерилизованы автоклавированием при 1 атм. в течение 60 мин. В контрольные флаконы вносили по 2 мл питательной среды LB, в опытные - по 2 мл инокулума *S. epidermidis* 33 в LB, содержащего 10^7 КОЕ/мл. Пробы инкубировали при 37° С в течение 1-5 суток. По окончании инкубации планктонная культура удалялась, катетеры трижды промывались 10 мМ фосфатным буфером (pH 7,2) и окрашивались 0,1% раствором генцианвиолета в течение 20 мин. Избыток красителя удаляли промыванием тем же буфером. Связавшийся с биопленкой генцианвиолет, характеризующий ее биомассу, экстрагировали этанолом. Детекцию интенсивности окраски проводили на спектрофотометре Apel PD-303 (Япония) при длине волны 570 нм. В результате исследований *in vitro* для экспериментов на животных были выбраны катетеры фирмы Apexmed International, на которых образование биопленки было наиболее интенсивным.

Исследования проводились на 14 белых беспородных мышах, весом 25–30 г. Всем животным под эфирным наркозом под кожу спины вводился фрагмент пластикового катетера. В зависимости от предварительной обработки катетера животные были разделены на три группы. Первой группе вводили стерильные катетеры. Второй группе – катетеры с предварительно выращенными на них в течение двух суток биопленками. Третьей группе вводили стерильные катетеры и затем в операционную рану после ее закрытия вводили 0.5 мл взвеси стафилококка в физиологическом растворе, содержащей 10^9 КОЕ/мл. Животных всех групп забивали на третьи, пятые и седьмые сутки. Для гистологического исследования забирали внутренние органы (тимус, почки, печень, селезенку) и ткани вокруг катетера, которые фиксировали в 10% растворе формальдегида. Обработку материалов проводили по общепринятой методике и окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону.

Результаты и обсуждение

У животных первой группы, забитых на третьи сутки после операции, в подкожной клетчатке на месте введения стерильного катетера отмечалось формирование грануляционной ткани, по периферии которой выявлялись скопления фибробластов, тонких разрозненных коллагеновых волокон и макрофагов. На пятые и седьмые сутки отмечалось созревание грануляционной ткани с формированием соединительнотканной капсулы, встречались гигантские клетки инородных тел.

У второй группы животных на третьи сутки на поверхности ка-

тетеров, наряду со скоплениями колоний стафилококков, выявлялась обильная инфильтрация гранулоцитами, макрофагами, тучными клетками. Слой грануляционной ткани был более выраженным, со значительным количеством гранулоцитов. На пятые сутки в инфильтрате отмечалось большое количество плазматических клеток и макрофагов. На седьмые сутки созревающая грануляционная ткань содержала значительно меньшее количество плазматических клеток и макрофагов, а коллагеновые волокна формировали пучки.

У животных третьей группы на третьи сутки фокусов нагноения не наблюдалось, грануляционная ткань содержала немногочисленные полинуклеары в составе клеточного инфильтрата. На пятые и седьмые сутки на месте введения катетера формировалась тонкая капсула, представленная фибробластами и пучками коллагеновых волокон, лимфоцитами, плазмоцитами, с примесью единичных нейтрофилов и макрофагов.

Во внутренних органах животных ярких морфологических различий между группами обнаружено не было.

Выводы

На основании проведенных исследований сделаны следующие выводы:

- наиболее интенсивное образование биопленок стафилококков в экспериментах *in vitro* наблюдается при использовании катетеров фирмы Apexmed International;
- подкожное введение покрытых биопленками катетеров приводит к более выраженной воспалительной реакции окружающих тканей по сравнению с введением взвеси стафилококков в зону имплантации стерильных катетеров;
- использованная модель катетер-ассоциированной инфекции может быть успешно применена для дальнейшего изучения влияния биопленок микроорганизмов на состояние окружающих тканей и внутренних органов, а также для оценки воздействия на биопленки *in vivo* различных антибактериальных соединений.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 10-04-96086-р_урал_а, 11-04-96025-р_урал_а, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биологиz" (проект № 09-П-4-1019) и УрО РАН (проекты №№ 09-М-14-2002, 10-14-12-НАБ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок. // Журнал микробиологии. – 2010. – № 4. – С. 97–104.
2. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – V. 15. – P. 167–193.
3. Mermel L., Farr B., Sheretz R., Raad I.I., O`Grady N., Harris J.S., Craven D. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 32. – P. 1249–1272.
4. Warran D., Zack J., Elward A., Cox M., Fraser V. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 33. P. 1329–1335.
5. Bouza E., San Juan R., Mucoz P., Pascau J., Voss A., Desco M. A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology, workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study) // Clin. Microbiol. Infect. – 2004. – V. 10. – P. 838–842.

Litvinov V.V.[1], Lemkina L.M.[2], Fraind G.G.[1], Korobov V.P.[2]

EXPERIMENTAL APPROACHES TO MODELING A CATHETER-RELATED INFECTION CAUSED BY *STAPHYLOCOCCUS* BIOFILMS

[1]Perm State Medical Academy, Perm, Russia

[2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, drlitvinov@ mail.ru

Summary. Modeling of a catheter-related infection in laboratory animals was performed to study the morphological reactions in tissues around the catheter. In the in vitro studies, we evaluated the intensity of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* 33 using different catheters. In the in vivo studies on 14 white mongrel mice, Apexmed International catheters were used demonstrating the highest intensity of biofilm formation. It was determined that subcutaneous catheters occupied by biofilm fragments evoked a more pronounced inflammatory reaction of surrounding tissues compared to that caused by the subcutaneous infusion of a Staphylococcus suspension at the implantation zone of sterile catheters. The proposed model of catheter-related infections can be used to evaluate the performance impact of various antibacterial compounds on biofilm formation in vivo.

Key words: model of catheter-related infections, biofilms, tissue morphology.

УДК 602:83:581.522.6

Лукаткин А.А., Ревин В.В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* 2006 НА РАСТЕНИЯ ОГУРЦА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва", г. Саранск, Россия, ussr1960@yandex.ru

Резюме. Исследовано влияние предпосевной обработки семян огурца биопрепаратом, созданным на основе *Pseudomonas aureofaciens*, на ростовые показатели растений. В ходе эксперимента варьировали концентрацию препарата. Показано, что для лучшего роста растений огурца необходимо использовать биопрепарат в разведении 1:200. Использование данной концентрации препарата способствовало лучшей всхожести семян, а также увеличению площади листовой пластинки и длины корневой системы растения.

Ключевые слова: биопрепарат, энергия прорастания, всхожесть, *Pseudomonas aureofaciens*.

Выводы

Современное интенсивное растениеводство немыслимо без использования регуляторов роста. Синтез необходимых для этого веществ в некоторых случаях выгоднее производить не химическим, а биологическим путем, в нашем случае привлекая микроорганизмы – бактерии [1]. Почва не насыщена микроорганизмами, она способна принять в себя популяции, внесенные извне [2]. Ризосфера является одним из немногих мест в почве, где вероятен быстрый рост микроорганизмов за счет постоянного притока корневых выделений, используемых бактериями для роста и метаболизма [3]. Одной из распространенных в ризосфере групп являются бактерии рода *Pseudomonas* [4]. Использование живых культур бактерий или их метаболитов имеет неоспоримые преимущества перед пестицидами и химическими удобрениями [5]. Однако для каждой культуры растений необходимо выявить оптимальные условия применения. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния различных концентраций биопрепарата, созданного на основе *Pseudomonas aureofaciens*, на характеристики прорастания семян и рост огурца.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили бактерии *Pseudomonas aureofaciens* штамм 2006. Культура *P. aureofaciens* 2006 выделена из почвы и отселекционирована на кафедре биотехнологии Мордовского государственного университета. Бактерии выращивали на скошенном питательном агаре (г/л): сахароза 10, дрожжевой экстракт 5, пептон 10, агар-агар 18. Для получения биопрепарата полученным посевным материалом засевали колбу объемом 250 мл со 100 мл жидкой фракции послеспиртовой барды. Выращивание проводили на качалке при 150 об/мин и температуре 25-26°С в течение 24 ч. Далее замачивали семена огурца сорта Невский в тече-

ние 3 ч. В ходе эксперимента использовали различные концентрации культуральной жидкости бактерий: 1:100, 1:200, 1:500, без разведения; контроль – водопроводная вода. После этого семена помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри. На 3-и и 7-е сут роста определяли энергию прорастания и всхожесть семян. Далее семена помещали в грунт и на 30-е сут роста определяли площадь листовой пластины и длину корневой системы растений.

Результаты и обсуждение

При выращивании сельскохозяйственных культур важным показателем является всхожесть семян. Поэтому на первом этапе исследования мы изучали влияние концентрации биопрепарата на энергию прорастания и всхожесть семян огурца (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние биопрепарата на энергию прорастания и всхожесть семян огурца, %

Показатель	Разведение биопрепарата				Контроль
	1:100	1:200	1:500	Без разведения	(вода)
Энергия прорастания	90±2	95±1	91±1	89±2	85±1
Всхожесть	93±1	100	94±1	93±2	91±2

Полученные результаты показывают, что биопрепарат в любых концентрациях способствовал лучшей всхожести семян по сравнению с контрольным вариантом. Однако максимальный результат выявлен при использовании биопрепарата в разведении 1:200. Полученные данные свидетельствуют о том, что в начале проращивания различная скорость прорастания опытных партий семян обусловлена большей разницей осмотических давлений в используемых биопрепаратах. Таким образом, в водном контроле, где вязкость, как и осмотическое давление, существенно меньше, чем в культуральной жидкости, вода более доступна семенам для активации процессов прорастания.

По мере развития проростков огурца большое значение оказывают выделяемые *P. aureofaciens* стимуляторы роста, в частности индолилуксусная кислота. Поэтому на следующем этапе изучали влияние биопрепарата на параметры роста – площадь листовой пластинки и длину корневой системы растений огурца (табл. 2).

Таблица 2.

Ростовые показатели огурца после предпосевной обработки биопрепаратом различной концентрации

Показатель роста	Концентрация биопрепарата			Без разведения	Контроль
	1:100	1:200	1:500		
Площадь листовой пластинки, см^2	15,1±1,2	21,0±1,5	13,7±1,2	15,3±2,2	12,1±2,0
Длина корневой системы, см	10,3±2,0	14,5±1,4	10,0±1,0	11,2±1,1	8,7±0,9

Полученные результаты согласуются с данными, полученными на первом этапе эксперимента. Использование биопрепарата на основе *P. aureofaciens* 2006 способствует лучшему росту растений в сравнении с контрольным вариантом. Большая площадь листовой пластины и длина корневой системы на 30-е сутки роста наблюдалась у растений, обработанных биопрепаратом в концентрации 1:200. Таким образом, результаты полученные в ходе эксперимента, показывают принципиальную возможность использования биопрепарата на основе *P. aureofaciens* 2006 для ускорения всхожести семян и увеличения ростовых показателей важной сельскохозяйственной культуры - огурца.

ЛИТЕРАТУРА

1.*Билай В.И.* Основы общей микологии. – Киев: Высшая шк., 1989. – 389 с.

2. *Кожевин П.А.* Микробные популяции в природе. – М.: МГУ. – 1989. – 171 с.

3. *Barber D.A.*, *Lynch J.M.* Microbial growth in the rhizosphere // Soil. Biol. Biochem. – 1977. – V. 9. № 5. – P. 305–308.

4. *Johanson P.M.*, *Wright S.A.I.* Low-temperature isolation of disease-suppressive bacteria and characterization of a distinctive group of *Pseudomonas* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 6464–-6474.

5. *Боровая В.Н.* НПА “Биота”: опыт производства и применения микробиологических препаратов // Защита и карантин растений. – 2001. – № 8. – С. 15–16.

Lukatkin A.A., *Revin V.V.*

EFFICIENCY OF GROWTH-STIMULATING ACTION OF BIOLOGICAL PREPARATION BASED ON *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* 2006 ON CUCUMBER PLANTS

N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia,

ussr1960@yandex.ru

Summary. Effect of cucumber seeds treatment by biological preparation based on *Pseudomonas aureofaciens* was investigated. Different concentrations of the biological preparation were used during the experiment, and their influence on seed germination and seedlings growth was assessed. It was shown that best effect was in case of biological preparation diluted in 200 times. Biological preparation improves cucumber seed germination as well as increases seedlings growth (leaf area and root length).

Key words: biological preparation, *Pseudomonas aureofaciens,* cucumber, germination, growth.

УДК 632.937.15, 577.18, 579.852.11

Лукьянцев М.А.[1], *Хайруллин Р.М.*[2]

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ АНТИБИОТИКОВ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ АНТАГОНИЗМА К ФИТОПАТОГЕННЫМ ГРИБАМ

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего профессионального образования “Башкирский государственный аграрный университет”, г. Уфа, Россия, lukyancev_ma@mail.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, krm62@mail.ru.

Резюме. Биологические препараты для защиты растений, созданные на основе эндофитных штаммов-антагонистов *Bacillus subtilis* - эффективная альтернатива химическим пестицидам. Однако наличие высокой антагонистической активности у бактериального штамма не всегда предопределяет эффективность препарата. Объектами исследования в представленной работе являлись три эндофитных штамма *B. subtilis*, различающиеся степенью антагонизма к фитопатогенным грибам и эффективностью использования в качестве агентов биоконтроля. Показано, что различия в биологической активности, в том числе противоречие “сильный антагонист – низкий уровень биоконтроля” у штаммов могут быть обусловлены неодинаковым составом синтезируемых ими антибиотиков.

Ключевые слова: биопрепарат, *Bacillus subtilis*, антибиотики, биоконтроль.

Введение

Химические пестициды в настоящее время остаются основными средствами защиты растений от болезней. Однако в силу ряда объективных причин их применение в практике растениеводства недостаточно эффективно и безопасно. Поэтому в качестве альтернативы традиционным химическим фунгицидам выступают биофунгициды, в том числе на основе микроорганизмов-антагонистов и/или их метаболитов, подавляющих рост и развитие фитопатогенов. Одними из наиболее перспективных кандидатов на роль «биофунгицидного на-

чала» являются бактерии рода *Bacillus*, в том числе эндофитные представители данной систематической группы [1, 2].

Наличие у бактериального штамма высокой антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микроорганизмам не всегда предопределяет успешность разработки будущего препарата на его основе. Так, полевые испытания могут выявить отсутствие ожидаемого защитного эффекта у штамма и даже подавление роста растений агентом биоконтроля [3]. Столкнувшись с этим в ходе исследований свойств эндофитных штаммов-антагонистов *B. subtilis,* мы предположили, что одной из причин фитотоксичности бактерий и неспособности защищать растения от болезней в полевых условиях могут быть различия в составе и/или количестве продуцируемых ими антибиотиков. Для проверки гипотезы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) был проведен анализ антибиотиков штаммов *B. subtilis* 26Д, 11В и 49РН, отличающихся степенью антагонизма по отношению к фитопатогенным микромицетам. Штамм *B. subtilis* 26Д (основа коммерческого препарата "Фитоспорин М") использовался в качестве эталона и «положительного контроля». Штамм *B. subtilis* 11В проявлял самую низкую антагонистическую активность, но успешно выполнял функцию агента биоконтроля в полевых условиях на некоторых культурах, а штамм *B. subtilis* 49РН – наиболее сильный антагонист фитопатогенов *in vitro*, в полевых условиях, наоборот, не проявлял себя в защите растений. В качестве стандартов использовали антибиотики *B. subtilis* сурфактин и итурин (Sigma, США).

По данным ВЭЖХ, антибиотики группы итурина отсутствовали в продуктах метаболизма всех трех штаммов бацилл. Соединения, сходные по подвижности и спектру поглощения с сурфактином, обнаружены у штаммов *B. subtilis* 11В и *B. subtilis* 26Д. У штамма *B. subtilis* 49РН в значительных количествах обнаружено соединение, близкое к сурфактину по времени выхода из колонки, но имеющее существенно отличающийся от него спектр поглощения. Количественный анализ мажорных веществ во фракциях антибиотиков бактерий показал, что эти вещества присутствуют в значительных количествах – от 18% до 28%.

Таким образом, вещества, обуславливающие антагонистическую активность исследуемых штаммов, различаются по химической структуре. Антибиотики штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 11В содержат компонент, идентичный сурфактину, наличие фунгицидного эффекта у которого остается окончательно невыясненным [4], в то время как преобладающий компонент штамма *B. subtilis* 49РН отличается от него по структуре. Не исключено, что благодаря наличию именно этого соединения указанный штамм проявляет высокую антагонистическую активность *in vitro*, и в то же время является фитотоксичным. Эти свойства *B. subtilis* 49РН могут быть одной из причин отсутствия должного положительного эффекта от его применения для повышения продуктивности и устойчивости растений к болезням в полевых условиях.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ №11-04-97044-р_поволжье_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bacon C.W., Hinton D.M.* Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species // Biological control. – 2002. – V. 23. – P. 274–284.

2. *Powell K.A., Jutsum A.R.* Technical and commercial aspects of biological control products // Pestic. Sci. – 1993. – V. 37. – P. 315–321.

3. *Минина Т.С., Захарова Р.Ш., Уразбахтина Н.А., Хайруллин Р.М.* Новые эндофитные штаммы *Bacillus subtilis* как основа биофунгицидов // Вестник Казанского государственного аграрного университета. – 2009. – N. 2(12). – С. 55–59.

4. *Stein T. Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol. – 2005. – V. 56. – N. 4. – P. 845–857.

Lukyantsev M.A.[1], *Khairullin R.M.*[2]

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF SOME ANTIBIOTICS OF ENDOPHYTIC *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF ANTAGONISM TO PLANT PATHOGENIC FUNGI

[1]Bashkir State Agrarian University, Russia, Ufa, lukyancev_ma@mail.ru [2]Institute of Biochemistry and Genetics RAS, Russia, Ufa, krm62@mail.ru

Summary. Plant defensive biological preparations created on the base of endophytic antagonistic *Bacillus subtilis* strains are an effective alternative to chemical pesticides. However high antagonistic activity of the bacterial strain is not always predetermine the preparations efficiency. Three endophytic strains of *B. subtilis* with different ratio of antagonistic activity to plant pathogenic fungi and biocontrol efficiency have been used as the objects in this research. It had been shown, that the differences in biological activity of strains, including the contradiction «strong antagonist – low biocontrol level» are due to unequal antibiotics composition.

Key words: biological preparation, *Bacillus subtilis*, antibiotics, biocontrol.

УДК 612.017.11: 579.61: 57.083.3

Масленникова И.Л., Ширшев С.В., Некрасова И.В.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ *ESCHERICHIA COLI LUX*$^+$, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТОЗА

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, i.maslennikova@rambler.ru, shirshev@iegm.ru, nirina5@mail.ru

Резюме. Изучены биолюминесценция и выживаемость рекомбинантных бактерий *Escherichia coli* с lux-опероном *Vibrio fischeri* (Эколюм-5) и *Photorhabdus luminescence* (Эколюм-8) в присутствии опсонинов и нейтрофилов. Установлено, что фагоцитоз Эколюм-8 активно протекал с пулом интактных сывороток. Термочувствительность биолюминесценции Эколюм-5 послужила причиной низких значений индекса фагоцитарной активности нейтрофилов.

Ключевые слова: фагоцитоз, опсонизирующие факторы, биолюминесценция, *Escherichia coli.*

Введение

Фагоцитоз бактерий – динамичный процесс, исход которого определяется функциональным состоянием фагоцитирующей клетки и микроорганизма. Существующие методики позволяют оценить действие бактерицидных компонентов сыворотки крови и фагоцитоз нейтрофилов с использованием рекомбинантных бактерий *E. coli lux*$^+$ по ингибированию биолюминесценции [1, 2, 3, 4]. Однако показано, что использование сенсора Эколюм-8 не позволило провести биолюминесцентный анализ фагоцитарной активности, вероятно, вследствие иного происхождения и свойств его люциферазы (*lux*-гены *Photorhabdus luminescence*) [5]. С другой стороны, у Эколюм-8, наряду с другими биолюминесцентными тест-системами (Эколюм-5, Эколюм-6, Эколюм-9), отмечена примерно одинаковая чувствительность в отношении неорганических и органических веществ [1], что, возможно, связано с особенностями методологического подхода при оценке.

Целью работы явилось проведение сравнительной характеристики рекомбинантных штаммов *E. coli lux*$^+$ (lux-оперон *Vibrio fischeri* – Эколюм-5) и *E. coli lux*$^+$ (lux-оперон *P. luminescence* – Эколюм-8) по уровню биолюминесценции и выживаемости при фагоцитозе с разными опсонизирующими факторами.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штаммы *E. coli lux*$^+$ с lux-оперонами *V. fischeri* (Эколюм-5) и *P. luminescence* (Эколюм-8), созданные Даниловым с соавт. в МГУ им. Ломоносова [1].

Нейтрофилы периферической крови выделяли из гепаринизованной венозной крови здоровых доноров центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 и 1,112 г/мл). Фагоцитарная система состояла из суспензии нейтрофилов в среде Хенкса (10^6 кл/мл), пула термоинактивированных (56°С, 30 мин) или интактных сывороток крови (10%) и регидратированного сенсора *E. coli lux*$^+$ (10^6-10^8 кл/мл) (10%). Контрольные пробы содержали те же компоненты, но без нейтрофилов.

Индекс фагоцитарной активности (ИФА) оценивали по биолюми-

несценции сенсоров на планшетном люминометре Luminoscan Ascent (Финляндия) через 40 мин контакта с нейтрофилами и/или опсонинами, вычисляли по формуле: ИФА=$(X_1-X_2)/X_1$x100%, где X_1, X_2 – интенсивность биолюминесценции контрольной и опытной пробы, соответственно [3]. Выживаемость *E. coli lux*$^+$ определяли высевом на среду Эндо с ампициллином (50мкг/мл) через 40 мин контакта, количество выросших колоний (КОЕ/мл) подсчитывали через 24 ч. Индекс ингибирования роста (ИИР) рассчитывали по формуле: ИИР=($КОЕ_k$-$КОЕ_o$)/$КОЕ_k$x100%, где $КОЕ_k$, $КОЕ_o$ – число КОЕ/мл контрольной и опытной пробы, соответственно.

Результаты и обсуждение

Установлено, что нейтрофилы проявляли более высокую фагоцитарную активность в отношении сенсора Эколюм-8 с пулом интактных сывороток по сравнению с пулом сывороток без комплемента, что подтверждалось уровнем выживаемости бактерий (ИИР) в данных системах (таблица). Поскольку оптимумы работы люциферазы данного штамма и фагоцитарных систем совпадают и составляют 37°С, влияние температуры на биолюминесценцию бактерий и ИФА отсутствовало.

В системе с сенсором Эколюм-5 активность нейтрофилов в целом была ниже, чем с Эколюм-8. Тем не менее, присутствие комплемента в сыворотке положительно влияло на фагоцитоз. Однако, более высокое значение ИИР Эколюм-5 с пулом термоинактивированных сывороток по сравнению с пулом интактных свидетельствовали об изменении способности бактерий образовывать колонии. Возможное объяснение этого связано с повышением чувствительности данного сенсора с увеличением температуры до 37°С, т.к. высокая активность люциферазы проявляется при 28-30°С. Кроме того, сложная структурная организация lux-оперона Эколюм-5 (наличие регуляторных генов, SOS-боксов) создает трудности в интерпретации изменения биолюминесценции при оценке фагоцитарных свойств нейтрофилов. Поэтому возможность применения сенсора Эколюм-5 для заявленных целей требует дальнейшего изучения. В то время как сенсор Эколюм-8 позволяет проводить оценку фагоцитоза *in vitro* по ингибированию биолюминесценции в физиологических условиях.

Таким образом, при проведении биолюминесцентной оценки фагоцитоза следует учитывать структурные особенности, температурные оптимумы люциферазных систем рекомбинантных штаммов *E. coli lux*$^+$.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошникова Г.Е., Соловьева Л.Н., Каташев Ф.В., Завильгельский Г.Б.* Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник МГУ. Серия 16. Биология. – 2002. – № 3. – С. 20–24.

2. *Пшеничнов Р.А., Масленникова И.Л., Никитина Н.М. и др.* Метод изготовления Микробиолюминесцентного Индикатора Токсичности (МИТ) // Свидетельство ФГУП "ВНТИЦ". – 2007.

3. *Ширшев С.В., Куклина Е.М., Заморина С.А., Никитина Н.М., Некрасова И.В.* Способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови человека по степени гашения биолюминесценции // Патент РФ. № 2292553. 2007. Приоритет от 10.06.2005 г. Зарег. в Госреестре изобр. 27.01.2007 г.

4. *Дерябин Д.Г., Каримов И.Ф.* Биохемилюминесцентный способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов // Патент РФ № 2366953. 2009.

5. *Дерябин Д.Г.* Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Наука, 2009. – 246 с.

Таблица.

ИФА нейтрофилов и выживаемость *E. coli lux*$^+$

Сенсоры	ИФА нейтрофилов		Выживаемость *E. coli lux*$^+$					
	Пул интактных сывороток	Пул сывороток без комплемента	Пул интактных сывороток			Пул сывороток без комплемента		
			Контроль, КОЕ/мл	Опыт, КОЕ/мл	ИИР	Контроль, КОЕ/мл	Опыт, КОЕ/мл	ИИР
Эколюм 8	39,3±6,8	20,8±1,3*	(2,8+1,3) x10^5	(6,4±0,3) x10^{4*}	77,0	(1,3±0,4) x10^7	(0,9±0,3) x10^7	29,9
Эколюм 5	20,3±1,6	14,3±1,2*	(4,7±3,4) x10^5	(2,9±0,9) x10^5	37,5	(1,3±0,5) x10^6	(3,8±0,1) x10^{5*}	71,4

Примечание. *Достоверные различия между вариантами по t-критерию Стьюдента.

Maslennikova I.L., Shirshev S.V., Nekrasova I.V.

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* LUX $^+$ BEING USED FOR THE PHAGOCYTOSIS ESTIMATION

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, i.maslennikova@rambler.ru, shirshev@iegm.ru, nirina5@mail.ru

Summary. The bioluminescence and survival of recombinant bacteria *Escherichia coli* with lux-operon of *Vibrio fischeri* (Ekoljum-5) и *Photorhabdus luminescence* (Ekoljum-8) in opsonin and neutrophil presence were studied. It was established that the phagocytosis of Ekoljum-8 actively proceeded with the intact serum pool. Ekoljum-5 bioluminescence thermosensitivity has served as the reason for low neutrophil phagocytic activity index.

Key words: phagocytosis, opsonins, bioluminescence, *Escherichia coli*.

УДК 576.8.095

Минакова В.В.[1], *Карнаухова И.В.* [1], *Осинкина Т.В.*[2], *Минакова В.В.*[2]

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИЗОЦИМА ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ *ANODONTA CYGNEA*

[1] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Оренбургский государственный педагогический университет", г. Оренбург, Россия, minakova@mail.ru; [2] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Оренбургская государственная медицинская академия", г. Оренбург, Россия

Резюме. В эксперименте было показано, что моллюски вида *Anodonta cygnea* продуцируют множественные формы лизоцима, отличающиеся по оптимуму pH активности и антибактериальному действию. Лизоцим жаберной ткани активен в диапазоне pH от 4,0 до 6,0; лизоцим мантии имеет выраженный оптимум активности при pH 6,0. Антибактериальная активность жаберной ткани в 2-4 раза выше активности лизоцима мантии относительно исследованных культур микроорганизмов.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, лизоцим, антибактериальная активность.

Множественные формы ферментов - физически разделимые разновидности одного и того же фермента, ускоряющие одну и ту же реакцию, но различающиеся некоторыми физико-химическими показателями и, как правило, образующиеся в разных тканях. С начала 60-х годов резко возросло число работ, посвященных проблеме множественных форм ферментов, и к началу 80-х годов было высказано предположение о том, что не менее половины всех ферментов обладает изоформами [1, 2]. В 70-х годах прошлого века было обосновано существование множественных форм в яичном лизоциме птиц (утки, лебеди) [3, 4]. В последние десятилетия активно изучаются лизоцимы моллюсков, но в литературе отсутствуют данные об их множественности [5] .

В связи с ведущей ролью лизоцима в организме моллюсков-биофильтраторов и высокой степенью специализации жаберной ткани представлялось актуальным исследовать возможность продукции множественных форм лизоцима двустворчатыми моллюсками *Anodonta cygnea*.

Препарат лизоцима получали методом аффинной хроматографии на хитине экстрактов жаберной ткани и мантии моллюсков [6]. В элюатах фотометрически определяли количество белка и лизоцимную активность. Для дальнейших исследований отбирали наиболее активные фракции и исследовали влияние pH на активность лизоцима, а также антибактериальное действие препаратов [7].

Различия в характере кривых pH-активности для препаратов лизоцима жабер и мантии отображены на рисунке. Так, при pH ниже 6,0 активность лизоцима мантии быстро падает и при pH=4,0 составляет только 40% от исходной активности, тогда как для жабер-

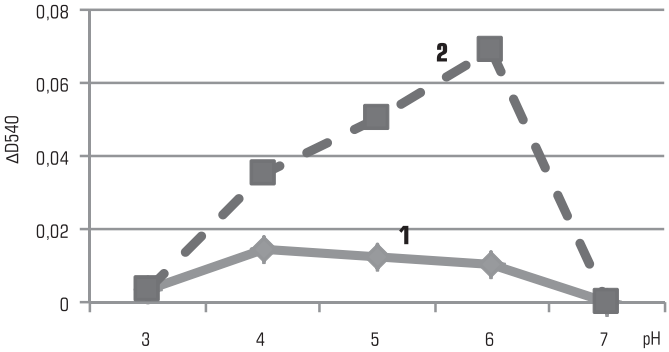


Рисунок. Влияние pH на активность лизоцима разных тканей моллюска *A.cygnea* (кинетика лизиса суспензии *M.lysodeikticus* за 1 минуту; содержание белка в препаратах 10 мкг/мл). Варианты опыта: 1 – препарат лизоцима жаберной ткани, 2 – препарат лизоцима мантии.

ного фермента такого падения не наблюдается, и его активность не изменяется в диапазоне pH от 4,0 до 6,0.

Результаты тестирования антибактериальной активности препаратов лизоцима жаберной ткани и мантии отражены в таблице.

Таблица.

Сравнительная характеристика антибактериальной активности препаратов лизоцима жаберной ткани и мантии

Микробная культура	Препарат лизоцима жаберной ткани		Препарат лизоцима мантии	
	МПК, мкг	Действующее разведение	МПК, мкг	Действующее разведение
Staphylococcus epidermidis	0,031	1/2 – 1/32	0,062	1/2 – 1/16
Mikrococcus lysodeikticus	0,008	1/2 – 1/128	0,016	1/2 – 1/64
Klebsiella pneumoniae	0,031	1/2 – 1/16	0,125	1/2 – 1/4
Escherichia coli	0,031	1/2 – 1/16	0,125	1/2 – 1/8

Примечание. - штамм № 2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича, остальные культуры – клинические изоляты.

Как видно из данных таблицы, препарат лизоцима жаберной ткани проявляет более высокую активность в отношении всех тестируемых культур микроорганизмов по сравнению с лизоцимом мантии, приблизительно в 2 – 4 раза выше, что подтверждается действующим разведением и значением МПК лизоцима.

Обнаруженные в эксперименте различия в оптимуме pH действия и антибактериальной активности лизоцима жаберной ткани и мантии беззубок свидетельствуют о возможном отличии в их структуре и позволяют сделать вывод о том, что данный вид моллюсков продуцирует тканеспецифичные формы лизоцима. Таким образом, можно говорить о множественных формах лизоцима моллюсков *Anodonta cygnea*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Уилкинсон Дж.* Изоферменты. – М.: Мир, 1968. – 187 с.
2. *Филиппович Ю.Б., Коничев А.С.* Множественные формы ферментов насекомых и проблемы сельскохозяйственной энтомологии. – М.: Наука, 1987. – 168 с.
3. *Bachali S., Jager M., Hassanin A., Schoentgen F., Jolles P., Fiala-Medioni A.* Phylogenetic Analysis of Invertebrate Lysozymes and the Evolution of Lysozyme Function // Molecular Evolution, 2002. – N.54. – C. 652–664.
4. *Jolles J., Hermann J., Niemann B., Jolles P.* Differences between the Chemical Structures of Duck and Hen Egg-white Lysozymes // European J. Biochem., 1967. – N.1. –C. 344–346
5. *Norman A., Steller R.* Multiple Genes for Lysozyme in Birds // Archives of biochemistry and biophysics, 1970. – N.141. – C. 656–661
6. *Коробов В.П., Лемкина Л.М., Карнаухова И.В., Полюдова Т.В., Соловых Г.Н., Павлова М.М.* Лизоцим двустворчатого моллюска *Unio pictorum* // Доклады академии наук, 2003. –Т. 391. – N.1. – С. 120–122
7. *Коробов В.П., Соловых Г.Н., Лемкина Л.М., Карнаухова И.В., Минакова В.В.* Исследование антибактериальной активности лизоцима двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* // Биология внутренних вод. Приложение к журналу. – М.: Из-во «Наука», 2008. – С. 12–16.

Minakova V.V.[1], Karnauhova I.V.[1], Osinkina T.B.[2], Minakova V.V. [2]

RESEARCH OF THE LYSOZYME FROM VARIOUS TISSUES OF BIVALVIA MOLLUSCUMS *ANODONTA CYGNEA*

[1]Orenburg State Pedagogical University, Orenburg, Russia, minakova@mail.ru; [2]Orenburg State Medical Academy, Orenburg, Russia

Summary. In experiment it has been shown that molluscums of kind *A. cygnea* produce the plural forms of a lysozyme differing on working conditions (pH an optimum) and antibacterial activity. The lysozyme of a branchiate tissue is active in a range pH from 4.0 to 6.0 without activity change; the mantle lysozyme has expressed оптимум pH 6.0. Antibacterial activity of a branchiate tissue in 2-4 times above activity of a lysozyme of a mantle concerning tested cultures of microorganisms.

Key words: bivalvia molluscums, lysozyme, antibacterial activity.

УДК: 616.314.17 – 002 + 616 – 008.939

Осьмуха У.Г., Латюшина Л.С., Синицкий А.И., Козочкин Д.А.

ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ КАТЕГОРИЯМИ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-МОДИФИЦИРОВАННЫМИ БЕЛКАМИ В СЛЮНЕ БОЛЬНЫХ С АПИКАЛЬНЫМ ПЕРИОДОНТИТОМ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Челябинск, Россия, biochem2009@mail.ru

Резюме. Острый периодонтит и обострение хронического периодонтита характеризуются специфическими изменениями в содержании продуктов липопероксидации и окислительной модификации белков в слюне.

Ключевые слова: периодонтит, свободно-радикальное окисление, слюна.

Введение

Воспалительные заболевания периодонта представляют одну из наиболее актуальных проблем стоматологии, имеющей социальную значимость, что обусловлено высокой распространённостью его среди населения. Пусковым моментом в развитии апикального периодонтита является колонизация корневого канала микроорганизмами и их размножение в нём. Некоторые бактерии (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonai* и *Prevotella*) оказывают прямое цитотоксическое действие на ткани периодонта. Вызванная ими альтерация провоцирует инфильтрацию фагоцитирующими клетками, а бактериальные антигены, не всегда обладая прямой цитотоксичностью, способствуют запуску иммунных процессов с участием лимфоцитов и макрофагов [4]. Любое воспаление, вызванное бактериальной инфекцией, сопровождается усилением свободно-радикального окисления.

Целью данного исследования являлось изучение соотношения между продуктами липопероксидации и окисления белков у больных с апикальным периодонтитом.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 52 пациентах, обращавшихся за меди-

цинской помощью в плановом и экстренном порядке с диагнозами: “Острый апикальный периодонтит” (К04.4); “Хронический апикальный периодонтит” (К04.5). Контрольную группу составили 16 клинически здоровых человек, сопоставимых по полу, возрасту, месту проживания, с санированной полостью рта. Пациенты были разделены на 2 группы, в зависимости от длительности и тяжести воспалительных явлений в периапикальных тканях причинного зуба.

1 группа, n=34 человека: больные с начальными формами (“дебютом”) апикального периодонтита. Пациенты с острым апикальным периодонтитом (К04.4) (МКБ-С, 1997), что соответствовало острому периодонтиту в фазу интоксикации.

2 группа, n=18 человек: пациенты с хроническим апикальным периодонтитом (К04.5) (МКБ-С, 1997) (соответствует деструктивным формам хронического периодонтита – хроническому гранулирующему и хроническому гранулематозному) в период обострения.

По методике И.А. Волчегорского и соавторов [1] в слюне определялось содержание первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (кетодиены и сопряжённые триены) молекулярных продуктов перекисного окисления липидов. Содержание конечных продуктов ПОЛ - Шиффовых оснований, определялось по методике Е.И.Львовской и соавторов [3]. Окислительную модификацию белков в слюне оценивали по методике Е.Е. Дубининой [2].

Полученные результаты обрабатывались пакетом статистических программ Statistica 6.0 for Windows, с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки (M ± m). Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $p \leq 0,05$. О достоверности различий показателей в сравниваемых группах судили по непараметрическим критериям Манна-Уитни, Вальда - Вольфовица.

Результаты и обсуждение

В слюне пациентов 1-й группы (острый апикальный периодонтит, фаза интоксикации) наблюдалось усиление липопероксидации, что проявлялось в увеличении содержания гептан-растворимых продуктов липопероксидации в слюне на фоне снижения содержания изопропанол-растворимых молекулярных продуктов ПОЛ и увеличении содержания карбонилированных белков (таблица).

Таблица.

Показатели ПОЛ и окисления белков при апикальном периодонтите

Опыт	ДК (изопропанол)	ШО (изопропанол)	КДиСТ (гептан)	ОМБ (мкМ/г белка)
Контроль n=16	0,603±0,06	0,14±0,017	0,122±0,028	1,81±0,14
Острый периодонтит n=34	0,491±0,052 P=0,028U	0,157±0,006	0,173±0,017 P=0,018U	4,55±0,29 P=0,018U
Хронический периодонтит (обострение) n=18	0,58±0,065	0,185±0,01 P=0,027U	0,15±0,081	1,03±0,24 P=0,049U

Примечание. Количество продуктов ПОЛ выражено в единицах индекса окисления. ДК – первичные (диеновые конъюгаты), КД и СТ – вторичные продукты (кетодиены и сопряженные триены), ШО – конечные продукты (основания Шиффа) ПОЛ. ОМБ – окислительная модификация белка. U – непараметрический критерий Манна – Уитни.

Для периода обострения хронического апикального периодонтита характерно увеличение содержания изопропанол-растворимых Шиффовых оснований. Кроме того, было отмечено снижение содержания карбонилированных белков.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о синхронном усилении липопероксидации и карбонилирования белков при остром периодонтите и разнонаправленном изменении этих процессов при обострении хронического периодонтита и позволяют прийти к заключению об усилении при апикальном периодонтите различных звеньев свободно-радикального окисления в слюне больных, которое зависит от клинической формы и стадии заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э.* Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптационных реакций организма. – Челябинск: Изд-во Челябинского государственного педагогического университета, 2000. – 167 с.
2. *Дубинина Е.Е.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 41. – С. 24–26.
3. *Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И.* Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов/ // Вопросы мед. химии. –1991. – № 4. – С.92–94.
4. *Митронин А.В, Робустова Т.Г., Максимовский Ю.М. Лебедев К.А. Понякина И.Д.* Клинико-иммунологическая характеристика деструктивных форм хронического периодонтита // Российский стоматологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 29–34.

Osmuha U.G., Latushina L.S., Sinitskii A.I., Kozochkin D.A.

CHANGING BALANCE BETWEEN DIFFERENT CATEGORIES OF PRODUCTS LIPID PEROXIDATION AND OXIDATION-MODIFIED PROTEINS IN THE SALIVA WITH APICAL PERIODONTITIS

Chelyabinsk state medical academy, Chelyabinsk, Russia

Summary. Acute exacerbation of chronic periodontitis and periodontal disease are characterized by specific changes in the content of lipid peroxidation products and redox-modified proteins in the saliva.

Key words: periodontitis, free-radical oxidation, saliva.

УДК 579.8+581.557:582.594.2

Первушина К.А.[1], Маракаев О.А.[1], Холмогоров С.В.[1], Шеховцова Н.В.[1], Осипов Г.А.[2]

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕБЛЕКОРНЕВЫХ ТУБЕРОИДОВ КАК ОРГАНОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ

[1]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова”, г. Ярославль, Россия, bioksusha@mail.ru; [2]Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, г. Москва, Россия, osipovga@mail.ru

Резюме. Стеблекорневые тубероиды *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae) являются местообитанием эндофитных бактерий, их общая численность в старых органах составляет 10^8, в молодых – 10^7 усл. кл/г сухой биомассы. Многообразие культивируемых микроорганизмов было представлено 27 изолятами грамположительных бактерий родов (рр.) *Bacillus*, *Rhodococcus* и *Streptomyces.* Методом маркерного анализа в запасающих органах были обнаружены рр. *Bacillus*, *Rhodococcus, Nocardia, Pseudonocardia, Actinomadura*.

Ключевые слова: орхидные, стеблекорневой тубероид, эндофитные бактерии.

Ведение

Стеблекорневой тубероид – запасающий орган некоторых видов орхидных, из которого получают фармацевтический препарат салеп, обладающий обволакивающим, противовоспалительным, омолаживающим и тонизирующим эффектами [1, 2]. Использование тубероидов сдерживается редкостью и необходимостью охраны орхидных [3], в перспективе оно может быть расширено благодаря активной и успешной разработке методов семенного, вегетативного (ризорестуционного), макро- и микроклонального размножения [2]. Рост и развитие тубероидов орхидных связаны с ассоциативными микро-

организмами – компонентами устойчивых мутуалистических взаимодействий [4]. Эндофитные бактерии стеблекорневых тубероидов, тем не менее, остаются до настоящего времени неизученными. В связи с этим цель работы – выявление многообразия эндофитных микроорганизмов в стеблекорневых тубероидах *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae) методами анализа липидных биомаркеров и посева на питательные среды.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись тубероиды, поверхность которых обрабатывали 5 минут 6% раствором хлорамина для удаления микроорганизмов. Состав бактериоценоза выявляли на основе анализа жирнокислотных биомаркеров в липидном профиле воздушно-сухих тубероидов по известному алгоритму [5]. Изоляты бактерий выделяли путем посева проб сырой биомассы на плотные питательные среды:с 50 мкг/мл нистатина для ингибирования роста грибов при 28°С [6]. Морфотипы бактерий определяли по культуральным и морфологическим свойствам.

Результаты и обсуждение

Методом маркерного анализа установлено, что общая численность эндофитных бактерий в старых тубероидах в 2,7 раза выше, чем в молодых (табл.). В целом в тубероидах идентифицировано 26 родов бактерий, из которых 15 являются общими, а 7 и 4 специфичны для старых и молодых органов соответственно. Показано, что в эндофитном микробоценозе присутствуют грамположительные (10 родов – в старых, 7 – в молодых тубероидах) и грамотрицательные (по 12 в обоих тубероидах) бактерии.

Таблица.

Характеристика эндофитных бактерий стеблекорневых тубероидов *D. maculata*

Тубероид*	Результаты анализа липидных биомаркеров		Количество изолятов на питательных средах	
	Общая численность, усл. кл/г сухой биомассыX10^6	Количество родов	Среда Чапека	Крахмало-аммиачный агар
Старый	100	22	18	14
Молодой	37	19	22	16

Примечание. *Старый тубероид – сформированный в прошлом вегетационном периоде, молодой – образующийся в процессе текущей вегетации.

На разных питательных средах из тубероидов выделено от 14 до 22 изолятов (таблица), которые были представлены 27 культурами грамположительных бактерий. Грамотрицательных не обнаружено. На двух средах – среде Чапека и крахмало-аммиачном агаре было выделено по 22 культуры как из старых, так и молодых тубероидов, 18 из которых были для них общими.

Из старых и молодых тубероидов выделены изоляты четырех групп: I – палочки, образующие эндоспоры (р. *Bacillus*); II – актинобактерии, представленные неспорообразующими формами, характеризующимися плеоморфным ростом со стадиями кокков и нитей с зачатками ветвления или ветвящихся (р. *Rhodococcus*); III – актинобактерии, формирующие воздушный мицелий (р. *Streptomyces*); IV – смешанные культуры споро- и неспорообразующих палочек. В основном эндофиты тубероидов представлены микроорганизмами I и II групп, для старых органов – по 8 культур, для молодых – 11 и 6 соответственно. Разнообразие бактерий III группы в обоих случаях составляло 4 культуры, группа IV была представлена в старых тубероидах одним изолятом, а в молодых – двумя. По данным маркерного анализа в сообществе эндофитных микроорганизмов тубероидов I группа была представлена р. *Bacillus* (4 – 7%); II группа – р. *Rhodococcus* (4 – 5%); III – рр. *Nocardia, Pseudonocardia, Actinomadura* (1 – 3%).

Заключение

Таким образом, тубероиды *D. maculata* являются местообитанием эндофитных бактерий, их общая численность в старых органах составляет 10^8, в молодых – 10^7 усл. кл/г сухой биомассы. Культивируемые микроорганизмы (рр. *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*) являются продуцентами биологически активных веществ – антибиотиков, гормонов и др., которые могут участвовать в регуляции важнейших физиолого-биохимических процессов растения, оказывая прямое или косвенное влияние на его рост и развитие [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Осетров В.Д.* Орхидеи как лекарственные растения // Охрана и культивирование орхидей. Киев: Наукова думка, 1983. – С. 9–10.
2. *Широков А.И., Коломейцева Г.Л., Буров А.В., Каменева Е.В.* Культивирование орхидей европейской России. Нижний Новгород, 2005. – 64 с.
3. *Татаренко И.В.* Орхидные России: жизненные формы, биология, вопросы охраны. М.: Агрус, 1996. – 206 с.
4. *Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Маракаев О.А., Холмогоров С.В., Осипов Г.А.* Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами орхидных средней полосы России // Проблемы агрохимии и экологии. – 2010. – № 4. – С. 30–36.
5. *Верховцева Н.В., Осипов Г.А.* Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценозов // Проблемы агрохимии и экологии. – 1998. – № 1. – С. 51–54.
6. *Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I.* Bacteria, associated orchid roots and microbial production of auxin // Microbiol. Res. – 2007. – V. 162. – P. 69–76.
7. *Игнатов В.В.* Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005. – 262 с.

Pervushina K.A.[1], Marakaev O.A.[1], Kholmogorov S.V.[1], Shehovtsova N.V.[1], Osipov G.A.[2]

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF TUBERS AS ORGANS WITH MEDICINAL PROPERTIES

[1]Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia, bioksusha@mail.ru; [2]Bakulev Scientific Center of Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia, osipovga@mail.ru

Summary. The tubers of *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae) are the habitat of endophytic bacteria. Bacteria total number in the old organs is 10^8, in the young – 10^7 cells per gram of dry tuber weight. Cultured microorganisms biodiversity was represented by 27 gram-positive bacteria culture: *Bacillus*, *Rhodococcus* and *Streptomyces* genera were isolated. Then *Bacillus*, *Rhodococcus, Nocardia, Pseudonocardia, Actinomadura* genera were identified in microbal communities of tubers by biomarker analysis.

Key words: orchids, tuber, endophytic bacteria.

УДК 615.387.014.45

Ренева Л.В.[1], Волкова Л.В.[1], Черешнев В.А.[2, 3]

ДИНАМИКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА К КЛЕЩЕВОМУ ЭНЦЕФАЛИТУ У АКТИВНЫХ ДОНОРОВ ПЛАЗМЫ

[1]Федеральное государственное унитарное предприятие научно-производственное объединение “Микроген” Минздравсоцразвития России в г. Пермь “Пермское НПО “Биомед”, г. Пермь, Россия, l.v.reneva@mail.ru, wolkowalw@mail.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия; [3] Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Донорский иммуноглобулин против клещевого энцефалита на сегодняшний день является основным средством терапии клещевого энцефалита. Заготовить необходимые объемы плазмы крови для производства иммуноглобулина, повысить специфическую активность препарата и одновременно рационально использовать донорский контингент позволяет новый подход к комплектованию групп иммунных доноров, а именно – целенаправленный отбор доноров, у которых предполагается активная выработка специфических антител.

Ключевые слова: доноры, иммунитет, вакцинация, антитела, клещевой энцефалит.

Введение

На сегодняшний день в России регистрируется от 3,5 до 7 случаев заболевания на 100 тыс. населения, что соответствует 5-10 тыс. случаев заболеваний клещевым энцефалитом (КЭ) в год, треть заболевших составляют дети. Практически повсеместное распространение природных очагов КЭ на территории нашей страны указывает на необходимость создания эффективных мер профилактики и терапии этого заболевания. Основным средством лечения КЭ является донорский иммуноглобулин, содержащий антитела к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) и предназначенный для внутримышечного или внутривенного введения. Своевременное применение специфических иммуноглобулинов позволяет снизить заболеваемость КЭ более, чем в 5 раз, а в случае заболевания избежать осложнений и летальности. Однако потребности здравоохранения в этих препаратах удовлетворены далеко не полностью. Производство иммуноглобулинов против КЭ затруднено ограниченностью кадров доноров, их большим отсевом в процессе обследования и иммунизации.

Цель настоящей работы – оценка специфической активности антител, длительности и напряженности поствакцинального иммунитета к клещевому энцефалиту у активных доноров плазмы, которая используется в технологии направленных иммуноглобулинов.

Материалы и методы исследования

Оценена динамика поствакцинального иммунитета у 156183 активных доноров плазмы для фракционирования за период с 2006-2010 гг., в возрасте от 18 до 63 лет, из них 47% составляли мужчины и 53% женщины. Активность специфического гуморального иммунитета исследовали в динамике, на протяжении периода сохранения, необходимого для производства препарата титра антител методом РТГА с диагностикумом клещевого энцефалита сухим производства НПО "Вирион" (г. Томск). Для иммунизации доноров использовали вакцину клещевого энцефалита культуральную очищенную, концентрированную, инактивированную сорбированную (ЭнцеВир) производства ФГУП НПО "Микроген" МЗ РФ НПО "Вирион" г. Томск.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ 156183 образцов сывороток, взятых у доноров из различных районов Пермского края, показал, что содержание антител к ВКЭ в титре не менее 1:20 составляет 36 %. Среди доноров, в плазме которых определяли антитела к ВКЭ в титре 1:20 и выше, 44,6% составляют доноры, вакцинированные в донорском пункте, 35,5% доноров имели вакцинации против КЭ в анамнезе, по месту жительства или работы, 19,9% не имели вакцинации от КЭ, но при этом 70,2% из них посещали лесные массивы, а 27,8% имели случаи укусов клещей.

Скрининг первичных доноров показал, что 8,8% имеют титр 1:20 и более, 36,7% 1:10 и 54,5% не имеют титров к ВКЭ. Проведена оценка двух схем иммунизации (двукратная и трехкратная) с ревакцинацией через 1 год после завершения первичного курса вакцинации. По первой схеме проведена вакцинация 450 донорам и 5721 донорам по второй схеме. Среди вакцинированных доноров определены две группы: первая - доноры со слабым гуморальным ответом с титром АТ-ВКЭ ниже 1:10 и продолжительностью сохранения титров менее 60 дней, вторая - доноры с активным иммунным ответом с титром АТ-ВКЭ не ниже 1:20 и продолжительностью сохранения титра не менее 60 дней. При этом титр 1:10 считали низким, 1:20- средним, 1:40 и более - высоким. Слабый иммунный ответ (1:10) отмечен у 21,8% вакцинированных, 3,2% не дали ответа на вакцинацию. В результате иммунизации активная выработка антител отмечалась у 75% доноров (1:20-1:640), слабое антителообразование отмечено у 25% доноров. Оценка эффективности схем иммунизации показала, что на вакцинацию по первой схеме активной выработкой антител ответили 63,8%, иммунизация по второй схеме вызвала активный иммунный ответ 72,4% доноров. Длительность циркуляции антител прямо пропорциональна величине титра. Продолжительность сохранения титра в случае выявления у доноров низких титров АТ-ВКЭ – в среднем 8 недель, в случае средних титров – 16-17 недель, высоких титров – 28-31 недель. В результате ревакцинации активными антителопродуцентами были доноры с двукратной иммунизацией – 74,2%, после трехкратной иммунизации – 85,2%. Положительный иммунный ответ на повторную ревакцинацию отмечалась у 81,8% доноров и у 85,1%доноров соответственно для иммунизации по схеме первой и второй. Анализ зависимости активности гуморального иммунитета от пола, возраста, групповой (АВО) и резус-принадлежности проведен у 530 доноров, иммунизированных вакциной КЭ. В соответствии с возрастом доноры - активные антител продуценты (с титром антител 1:20 и выше) были разделены на 3 возрастные группы: I – от 20 до 30 лет (226 человек), II – от 30 до 40 лет (246 человек), III – 40 лет и старше (58 человек). В изученных группах процент активно ответивших на вакцину КЭ доноров составил 73,4%, 72,4%, 58,6% соответственно в первой, второй и третьей группах. Доля доноров со слабым иммунным ответом составила 26,6%, 27,6% и 41,4% соответственно. Доноры III группы достоверно чаще отвечали на ВКЭ слабой выработкой специфических антител. Среди 53% вакцинированных женщин активно на вакцину КЭ ответили 78,2%, среди 47% мужчин – (54,5%).

Заключение

Таким образом, полученные данные показали, что использование только серологического скрининга доноров не позволяет заготовить для производства направленного иммуноглобулина необходимый объем иммунного сырья. Наиболее эффективной схемой иммунизации доноров является трехкратная вакцинация вакциной КЭ, при этом длительность циркуляции антител ВКЭ прямо пропорциональна величине титра. Показана зависимость величины иммунного ответа на вакцину КЭ от возраста и пола донора, так, наибольший эффект иммунизации достигнут при вакцинации женщин в возрасте от 20 до 40 лет.

Reneva L.V.[1], Volkova L.V.[1], Chereshnev V.A.[2,3]

ASSESSMENT OF THE SPECIFIC ACTIVITY, DURATION AND INTENSITY OF POSTVACCINAL IMMUNITY TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS IN ACTIVE DONORS OF PLASMA

[1]"Microgen" Health and Social Development Ministry of Russia in the city Perm, The Perm Scientific Production Association "Biomed", Perm, Russia, l.v.reneva@mail.ru, wolkowalw@mail.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia; [3]Institute of immunology and physiology, Ekaterinburg, Russia

Summary. Donor immunoglobulin containing antibodies to the virus of tick-borne encephalitis, for today is the main means of treatment of tick-borne encephalitis. Prepare the necessary volume of blood plasma for the production of immunoglobulin, to increase the specific activity of the drug and at the same time rational use of donor contingent allows a new approach to the acquisition of groups of immune donors, namely – a focused selection of donors, from which it is supposed to active development of specific antibodies.

Key words: donors, immunity, vaccination.

УДК 612.014.46:-612.112

Свиридова Т.Г., Ибрагимова Р.М.

ЭФФЕКТЫ БАКТЕРИЛЬНЫХ АУТОРЕГУЛЯТОРОВ (АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ И ГОМОСЕРИНЛАКТОНОВ) НА ФАГОЦИТАРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Оренбургский государственный университет", г. Оренбург, Россия, kobtg@yandex.ru

Резюме. Установлена способность малых регуляторных молекул микроорганизмов - алкилоксибензолов (автоиндукторов анабиоза) и гомосеринлактонов (автоиндукторов системы кворума) изменять функциональные характеристики фагоцитов периферической крови человека. Выявлено ингибирующее воздействие данных факторов на процессы кислород-зависимого и кислород-независимого киллинга микроорганизмов нейтрофильными фагоцитами, а также продукцию цитокинов мононуклеарными фагоцитами. Охарактеризованы зависимости регистрируемых эффектов от особенностей химического строения и действующих концентраций бактериальных ауторегуляторов.

Ключевые слова: бактериальные ауторегуляторы, алкилоксибензолы, гомосеринлактоны, нейтрофилы, моноциты.

Ауторегуляторные факторы – обширная группа низкомолекулярных химических соединений, выделяемых микроорганизмами в околоклеточную среду и при достижении определенных пороговых концентраций оказывающих выраженное воздействие на их физиологическое состояние и репродуктивные способности. В частности, вещества группы гомосеринлактонов (ГСЛ) обуславливают плотностнозависимую индукцию генов биолюминесценции, антибиотикопродукции и вирулентности [1], а алкилоксибензолы (АОБ) выполняют функции индукторов перехода бактериальных клеток в гипометаболическое/анабиотическое состояние [2].

В связи с тем, что ауторегуляторные факторы указанных групп могут синтезироваться представителями микробиоценоза и инфекционными патогенами, закономерным оказался факт присутствия ГСЛ и АОБ в биологических жидкостях и тканях тела человека в микро- и наномолярных концентрациях [3,4], являющихся достаточными для проявления биологических эффектов данных соединений в отношении молекул и клеток эукариот [5, 6].

В частности, целью настоящей работы явилось исследование эффектов ГСЛ и АОБ в отношении ряда функциональных характеристик клеток фагоцитарного звена иммунной системы – нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека.

При проведении исследований в данном направлении установлено подавление люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови человека, инкубированных в контакте с химическими аналогами бактериальных ауторегуляторных молекул. Выявленные эффекты являлись дозозависимыми и существенно зависели от природы ауторегулятора, будучи более выраженными при использовании ГСЛ, нежели АОБ. В свою очередь внутри групп гомологов ГСЛ или АОБ подобная биологическая активность повышалась с увеличением длины углеводородного радикала.

Природа выявленного эффекта в присутствии миллимолярных концентраций ГСЛ и АОБ в значительной степени могла быть объяснена развитием их цитотоксического эффекта в отношении нейтрофильных фагоцитов. В свою очередь ингибирующий эффект более низких концентраций названных бактериальных ауторегуляторов оказывался опосредованным модуляцией активности ключевых ферментов окислительного метаболизма нейтрофилов и, в меньшей степени, собственными антиоксидантными свойствами АОБ.

Выявленное влияние ГСЛ и АОБ на кислород-независимую бактерицидную систему нейтрофилов определялось подавлением процессов дегрануляции данных клеток при контакте с фагоцитируемыми объектами, что дополнялось ингибированием ферментативной активности ряда продуцируемых бактериолитических ферментов (лизоцима) при взаимодействии с длинноцепочечными гомологами АОБ.

Установлены сонаправленные эффекты ГСЛ и АОБ на спонтанную и митоген-индуцированную продукцию цитокинов α-ФНО, ИЛ-1β и ИЛ-10 моноцитами периферической крови человека, выраженность которых зависела от наличия или отсутствия стимуляции, характера образуемого интерлейкина, природы и концентрации воздействующего ауторегулятора. Показано, что в отличие от нейтрофильных фагоцитов, ГСЛ и АОБ не вызывали цитотоксического эффекта в отношении исследованных цитокин-продуцирующих клеток.

Полученные результаты раскрывают новый механизм иммуномодуляции, обусловленный функциональной полимодальностью ауторегуляторных молекул из групп ГСЛ и АОБ, а также описывают ряд молекулярных и клеточных механизмов подобной активности, значимых для формирования сетевых взаимодействий в симбиотико-паразитарных системах.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 11-04-12057-офи-м.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Avantika L.* Quorum Sensing – how bacteria talk to each other // Resonans. – 2009. – P. 866–871.

2. *Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А. и др.* Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. – 2006. – Т. 75. № 4. – С. 446–456.

3. *Favre-Bonte S., Pache J.C., Robert J., Blanc D., Pechure J.C., van Delden C.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients // Microb. Pathog. – 2002. – V. 32. – P. 143–147.

4. *Ross A.B., Redeuil K., Vigo M., Serge R., Kornül N.* Quantification of alkylresorcinols in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2010. – V. 24. – P. 554–560.

5. *Ritchie A.J., Jansson A., Stallberg J., Nilsson P., Lysaght P., Cooley M.A.* The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-l-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation // Infect. Immun. – 2005. – V. 73. – P. 1648–1655.

6. *Дерябин Д.Г., Михайленко (Романенко) Н.А., Эль-Регистан Г.И.* Влияние алкилоксибензолов на антигенсвязывающую способность антител // Микробиология. – 2009. – Т. 78. № 5. – С. 629–635.

Sviridova T.G., Ibragimova R.M.

EFFECTS OF BACTERIAL AUTOREGULATORS (ALKYLOXYBENZENES AND HOMOSERIN LACTONES) ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD PHAGOCYTIC CELLS

Orenburg State University, Orenburg, Russia, kobtg@yandex.ru

Summary. The ability of microbial small regulatoric molecules - alkyloxybenzenes (anabiosis autoinducers) and homoserinlactones (quorum sensing autoinducers) to change the functional characteristics of human peripheral blood phagocytes is established. This factors inhibit the oxygen-dependent and oxygen-independent bactericidal mechanisms of neutrophilic phagocytes, and also depress the cytokines production by mononuclear phagocytes. Dependences of registered effects on chemical structure and operating concentration of bacterial autoregulators are characterized.

Key words: bacterial autoregulators, alkyloxybenzenes, homoserinlactones, neutrophils, monocytes.

УДК 577.11.115.3

Сигида Е.Н.[1], Федоненко Ю.П.[1], Коннова С.А.[1,2], Игнатов В.В.[1,2]

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЛИПИДОВ А ТИПОВОГО И МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия, room308@ibppm.sgu.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского”, г. Саратов, Россия, konnovasa@yandex.ru

Резюме. Из сухой биомассы бактерий четырех мутантных штаммов *Azospirillum brasilense* получены препараты липополисахаридов, для которых методом газо-жидкостной хроматографии охарактеризован профиль жирных кислот. Показано влияние мутаций на состав жирных кислот липидов А дериватов. В липополисахаридах двух штаммов *Azospirillum brasilense* выявлены характеры связей между хитобиозой и жирными кислотами.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, липополисахарид, липид А.

Введение

Свободноживущие грамотрицательные бактерии рода *Azospirillum* активно исследуются в связи с их способностью устанавливать взаимовыгодные ассоциации с важнейшими сельскохозяйственными культурами [1]. Вопрос о механизме образования подобных взаимодействий остается открытым, но очевидна основополагающая роль в нем макромолекул поверхности азоспирилл, в частности липополисахаридов (ЛПС) – основных компонентов клеточной мембраны.

В состав молекулы ЛПС входит О-специфический полисахарид, олигосахарид кора и липид А. Последний имеет большое значение для целостности бактериальной мембраны и отвечает за проявление биологических свойств ЛПС. У большинства бактерий липид А представляет собой глюкозаминобиозу (хитобиозу), к которой присоединены остатки жирных кислот (ЖК) и другие заместители. Профиль ЖК липида А является общепризнанным хемотаксономическим критерием. Цель настоящей работы – получение препаратов ЛПС, сравнение состава ЖК липидов А родительского и мутантных штаммов *A. brasilense*, изучение характера связи ЖК с хитобиозой.

Материалы и методы исследования

В силу структурных особенностей ЛПС азоспирилл, ЛПС трудно гидролизуются классическим методом. В работе использовали спонтанные мутанты штамма *A. brasilense* Sp7 – Sp7.2, Sp7.4 и Sp7.K2, а также мутантный штамм *A. brasilense* Sp245.5. Изменения их генома оказали влияние на структуру ЛПС и, возможно, на способность липида А отделяться от углеводных заместителей под действием кислоты.

Культивирование микроорганизмов, последующее удаление с их поверхности капсульных полимеров, выделение и очистку ЛПС проводили согласно [2]. Деградацию ЛПС выполняли 2%-ной AcOH при 100°C в течение 2,5-6 ч. ЖК липида А в виде их метиловых эфиров (МЭЖК) идентифицировали с помощью метода ГЖХ на хроматографе GL-2010 (Shimadzu, Япония). *O*-дезацилирование ЛПС проводили 12%-ным NH_4OH при 37°C в течение 16 ч.

Результаты и обсуждение

Методом водно-фенольной экстракции получены препараты ЛПС штаммов *A. brasilense* Sp7.2, Sp7.4, Sp7.K2 и Sp245.5. Выход препаратов составлял 3-5 % от массы сухих клеток. Во всех препаратах обнаружены характерные для ЛПС компоненты: углеводы, 2-кето-3-дезоксиоктулозоновая кислота, гептоза и фосфор. Ранее в работе [3] был изучен профиль ЖК липида А *A. brasilense* Sp7. Во всех образцах ЛПС (см. таблицу) отмечено преобладание характеристических для азоспирилл кислот: октадеценовой ($C_{18:1}$), 3-гидрокситетрадекановой (3-OH $C_{14:0}$) и 3-гидроксигексадекановой (3-OH $C_{16:0}$). Для ЛПС *A. brasilense* Sp7.2 и Sp7.5 их суммарное содержание составляло более 70%, как и в случае ЛПС родительского штамма. В то же время для ЛПС штаммов *A. brasilense* Sp7.K2 и Sp245.5 наблюдалось снижение их доли до 50%. Примечательно, что содержание кислоты $C_{18:1}$ в ЛПС мутантных штаммов возростало в 2-6 раз по сравнению с родительским. В ЛПС *A. brasilense* Sp7.2 и Sp7.5 была идентифицирована непредельная гексадеценовая ($C_{16:1}$) кислота, а в ЛПС *A. brasilense* Sp7.K2 и Sp245.5 – декадеценовая ($C_{20:1}$). Известно, что непредельные кислоты в составе липида А влияют на компенсаторные свойства мембран и повышают адаптивность бактерий. Это объясняет увеличение их доли в ЛПС мутантных штаммов. Кроме того, во всех образцах были обнаружены гексадекановая ($C_{16:0}$) и нонадекановая ($C_{19:0}$) кислоты (за исключением ЛПС из *A. brasilense* Sp7). Можно отметить, что профиль ЖК всех исследуемых ЛПС являлся типичным для азоспирилл, однако, ЛПС штаммов *A. brasilense* Sp7.K2 и Sp245.5 имели ряд особенностей. Таким образом, изменения плазмидного состава *A. brasilense* Sp7 повлекли за собой перераспределение имеющихся и появление новых ЖК в составе дериватов липидов А.

Таблица.

Соотношение ЖК в препаратах ЛПС бактерий *A. brasilense* (в процентах от суммы всех идентифицированных ЖК в виде МЭЖК).

ЖК	Sp7.5	Sp7.2	Sp7 [3]	Sp7.K2	Sp245.5	Sp7.K2*	Sp245.5*
3-OH $C_{14:0}$	44,3	17,5	40,9	14,4	16,9	15,5	12,2
$C_{16:1}$	2,2	5,9	–	–	–	–	–
$C_{16:0}$	2,0	5,8	4,9	8,7	4,1	1,3	4,8
3-OH $C_{16:0}$	22,6	8,8	30,3	14,1	18,7	14,6	14,1
$C_{18:1}$	16,0	48,3	8,7	20,9	11,7	6,2	6,1
$C_{19:0}$	8,3	5,4	–	13,7	11,2	7,9	8,7
$C_{20:1}$	–	–	–	13,8	14,6	14,1	16,5

Примечания. * – *O*-дезацилированный ЛПС$ "–" – не найдено.

При проведении мягкого кислотного гидролиза ЛПС мутантных штаммов установлено, что в случае препаратов штаммов *A. brasilense* Sp7.K2 и Sp245.5 происходит выпадение характерного осадка липида А и его отделение от углеводной составляющей ЛПС за 2,5–3 ч, что открывает возможности для дальнейшего установления структуры этого компонента. При гидролизе ЛПС других исследуемых штаммов даже увеличение времени реакции до 6 ч не приводило к выпадению осадка.

Заключение

O-дезацилирование ЛПС – один из обязательных этапов при установлении структуры липида А. Выявлено снижение содержания ЖК $C_{16:0}$, $C_{19:0}$ и $C_{18:1}$ в модифицированных ЛПС после воздействия NH_4OH. Это свидетельствует о связывании хитобиозы с данными кислотами сложноэфирной связью, а с гидроксикислотами – амидной, устойчивой к воздействию мягкого щелочного гидролиза.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 11-04-00533.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Steenhoudt O., Vanderleyden J. Azospirillum*, a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – V. 24. – P. 487–506.

2. *Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V.* Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – V. 118. – P. 93–99.

3. *Игнатов В.В., Коннова О.Н., Бойко А.С., Фомина А.А., Федоненко Ю.П., Коннова С.А.* Характеристика состава жирных кислот липидов А липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum brasilense* // Изв. Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2009. – Т. 9. – С. 36–41.

Sigida E.N.[1], Fedonenko Yu.P.[1], Konnova S.A.[1,2], Ignatov V.V.[1,2]

PECULIARITIES OF THE LIPID A STRUCTURE OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* TYPE AND MUTANT STRAINS

[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, room308@ibppm.sgu.ru; [2]N.G.Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia, konnovasa@yandex.ru

Summary. Using gas-liquid chromatography, we determined the fatty acid profiles of the lipopolysaccharides (LPSs) obtained from dry biomass of four *Azospirillum brasilense* mutant strains. The influence of mutations on the lipid A fatty acid composition of the derivative strains was shown. In the LPSs of two strains, the bonds between fatty acids and chitobiose were characterized.

Key words: *Azospirillum brasilense,* lipopolysaccharide, lipid A.

УДК 615.462.03:616.314.17-008.1-036.12].015.8

Ситникова А.С., Старикова Н.Н., Быкова Л.П., Задорина И.И., Годовалов А.П.

ВЛИЯНИЕ ПЛОМБИРОВОЧНОГО МАТЕРИАЛА “РАДЕНТ” НА МИКРООРГАНИЗМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПЕРИОДОНТИТЕ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, AGodovalov@gmail.com

Резюме. Изучено влияние разных способов приготовления препарата “Радент” для пломбирования корневых каналов зубов на жизнеспособность возбудителей хронического периодонтита. В ходе проведенных исследований установлено, что препарат “Радент” обладает антибактериальными свойствами, которые могут быть статистически значимо увеличены при приготовлении препарата с использованием раствора хлоргексидина.

Ключевые слова: хронический периодонтит, кальцийсодержащий материал “Радент”, хлоргексидин.

Введение

Известно, что эндодонтическая инфекция является полимикробной; даже после тщательной биомеханической подготовки корневых каналов зубов в них могут оставаться патогенные микроорганизмы. Одной из причин неудачного лечения осложненных форм кариеса является резистентность некоторых видов микроорганизмов. Так, *Enterococcus faecalis и Candida albicans* весьма устойчивы к антимикробному действию гидроксида кальция из-за их способности проникать в дентинные трубочки и адаптироваться к меняющимся условиям [1]. Именно поэтому корневой пломбировочный материал должен обладать выраженным антибактериальным эффектом. Исходя из этого, поиск лучшей альтернативы привел к различным сочетаниям гидроксида кальция, например, с хлоргексидином; последний обладает достаточно широким спектром антибактериального действия в отношении аэробных и анаэробных микроорганизмов, а также различных видов *Candida*.

Цель исследования – определить антимикробную эффективность двух различных способов приготовления препарата “Радент”.

Материалы и методы исследования

В работе использовали материал для временного пломбирования корневых каналов зубов “Радент” (ф. “Радуга Р”, Россия), который состоит из гидроксида кальция (30%) и окиси цинка (70%). В первой серии опытов порошкообразный препарат “Радент” растворяли в дистиллированной воде, а во второй – с использованием 0,5% раствора хлоргексидина; для определения противомикробного действия препарата “Радент” использовали методику [2]. Чувствительность микроорганизмов определяли путем прямого нанесения проб материала “Радент” на газонный посев инокулюма тестируемого штамма, который по плотности соответствует 0,5 стандарту Мак-Фарланда и содержит примерно $1{,}5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Пломбировочный материал наносили на посев в объеме 40 мкл. Учет результатов исследования производили через 18-24 ч инкубации посевов при температуре +35°С, который выражался в миллиметрах диаметра зоны задержки роста тестируемых штаммов. Последние получены при микробиологическом исследовании содержимого зубных каналов пациентов с хроническими формами апикального периодонтита. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований установлено, что препарат “Радент” обладает антибактериальными свойствами. Вокруг препарата, нанесенного на среду, формируется четко видимая зона задержки роста всех исследуемых штаммов. При приготовлении препарата “Радент” с использованием хлоргексидина зона задержки роста статистически значимо увеличивается для всех исследуемых штаммов микроорганизмов (таблица).

Механизм антибактериального действия корневого пломбировочного материала “Радент” связан с наличием в его составе гидроксильного радикала, который вызывает перекисное окисление липидов клеточной стенки мембраны, а хлоргексидин способен генерировать производные галлоидов, которые являются активными окислителями. Использование же совместно гидроксидсодержащего препарата и хлоргексидина приводит к формированию аддитивного или синергистического эффекта [3].

Таблица.

Влияние препарата “Радент” на жизнеспособность микроорганизмов

Штаммы	Зона задержки роста, мм		P между группами
	“Радент” на дистиллированной воде	“Радент” на хлоргексидине	
Escherichia coli	9,8±0,7	17,8±1,5	<0,05
Citrobacter sp.	8,5±0,5	15,7±0,3	<0,05
Streptococcus Viridans	8,0±1,0	12,0±0,4	<0,05
Streptococcus pyogenes	10,2±1,3	12,1±1,2	>0,05
Staphylococcus aureus	9,0±0,4	18,2±0,9	<0,05
Candida albicans	8,1±0,4	15,8±1,1	<0,05
Staphylococcus hyicus	9,0±2,0	19,0±2,0	>0,05
Staphylococcus epidermidis	11,0±0,7	20,4±1,4	<0,05
Staphulococcus saprophyticus	11,3±0,5	19,6±1,4	<0,05
Staphylococcus haemolyticus	10,7±0,8	20,4±1,4	<0,05
Enterococcus sp.	9,5±1,5	15,0±1,0	>0,05

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что от типа транспортного средства, на котором замешивали гидроксидсодержащий препарат “Радент” в качестве внутриканального лекарственного средства, зависит его антимикробная активность; последняя может быть усилена за счет использования раствора хлоргексидина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Queiroz A.M., Nelson-Filho P., Silva L.A., Assed S., Silva R.A., Ito I.Y.* Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ // Braz. Dent. J. – 2009. – V. 20. N. 4. – P. 290–296.

2. *Lai C.C., Huang F.M., Yang H.W., Chan Y., Huang M.S., Chou M.Y., Chang Y.C.* Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens // Clin. Oral. Investig. – 2001. – V. 5. N. 4. – P. 236–239.

3. *Vaghela D.J., Kandaswamy D., Venkateshbabu N., Jamini N., Ganesh A.* Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An *in vitro* study // J. Conserv. Dent. – 2011. – V. 14. N. 2. – P. 182–186.

Sitnikova A.S., Starikova N.N., Bykova L.P., Zadorina I.I., Godovalov A.P.

THE STUDY OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT WAYS OF COMPOUNDING FILLING MATERIAL “RADENT” ON THE VIABILITY OF THE MICROORGANISMS, SELECTED WITH THE PERIODONTITIES

Academician E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, AGodovalov@gmail.com

Summary. We studied the influence of different ways of medication compounding for root canals dressing under all types of calcium-containing materials “Radent” on the viability of the causative agents of periodontosis. In the course of the studies was found that the medication “Radent” has antibacterial properties that can be statistically significantly increased in the medication compounding with the use of the chlorhexidine fluid.

Key words: chronic periodontitis, calcium-containing materials, chlorhexidin.

УДК 58 07.1, 577.1, 632.938

Сорокань А.В., Валеев А.Ш., Трошина Н.Б., Максимов И.В.

РЕГУЛЯЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ФИТОФТОРОЗА *PHYTO-PHTHORA INFESTANS* (MONT) DE BARY САЛИЦИЛОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТАМИ

Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия,

fourtyanns@googlemail.com

Резюме. Было исследовано влияние салициловой и жасмоновой кислот на устойчивость растений картофеля к фитофторозу и проведены цитологические исследования локальной пероксидазной активности, накопления лигнина и других фенольных соединений в местах инфицирования.

Ключевые слова: салициловая кислота, жасмоновая кислота, пероксидаза, лигнин.

Введение

В литературе широко обсуждается участие салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот в системной приобретенной устойчивости, однако многие данные противоречивы. Считается, что СК индуцирует в растениях устойчивость к биотрофным патогенам, а ЖК - к фитофагам и некротрофам. В литературе также описаны факты взаимного ингибирования СК- и ЖК- зависимых механизмов защиты против биотрофных и некротрофных патогенов и фитофагов [1]. Согласно другой точке зрения [2], СК и ЖК могут считаться либо синергистами, либо антагонистами при использовании различных их концентраций и их непосредственном воздействии на различные стороны метаболизма растений. В данной работе целью нашего исследования было выяснение влияния СК и ЖК в отдельности и при совместной обработке на отложение в клеточных стенках листьев картофеля лигнина и фенольных соединений, а также активность пероксидаз в местах инфицирования *Phytophthora infestans*.

Материалы и методы исследования

В исследованиях использовались пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.), восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя роза, культивируемые в течение 30-и суток на агаризованной среде Мурасиге-Скуга с добавлением СК (5Ч10-5) М и ЖК (1Ч10-7) М, а также их смеси. Затем часть материала инокулировали суспензией спор *P. infestans* (1Ч105 спор/мл) в количестве 5 мкл на каждый лист растения. Контролем служили неинфицированные растения, культивируемые без сигнальных молекул.

Отложение фенольных соединений определяли после фиксации инфицированных листьев в этаноле и окрашивания в 0,05% растворе толуидинового синего в 50 мМ цитратном буфере pH 3,5. Автофлуоресценцию лигнина выявляли с использованием фильтра, пропускающего ультрафиолетовые лучи в области 360 нм. Определение локализации пероксидаз проводили путем витального окрашивания листьев картофеля реагентом, содержащим 0,1 М ФБ, 0,01% 3,3-диаминобензидин и 0,02% H_2O. Затем листья фиксировали в 96%-ном этаноле, анализ материала проводили с помощью микроскопа Axio Imager. M1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, локализация фенольных соединений, лигнина и пероксидазная активность выявлялись в замыкающих устьичных клетках, что говорит о развитии защитного ответа непосредственно вблизи патогенных структур, так как возбудитель фитофтороза проникает в ткани в основном через устьичные щели.

Присутствие в среде культивирования салициловой и жасмоновой кислот способствовало локальной активации пероксидаз в месте инфицирования (рис. 2). СК и ЖК стимулировали в равной мере накопление фенольных соединений (субстратов пероксидаз) и лигнина в зоне инфицирования, причем смесь этих соединений обладала большим эффектом. Интересно, что под действием смеси СК и ЖК накопление фенольных соединений и лигнина происходило также и в неинфицированных листьях, а развитие симптомов фитофтороза на инфицированных листьях было наименьшим (таблица).

Таблица.

Развитие симптомов фитофтороза на инфицированных листьях *Solanum tuberosum*

Параметр	контроль	СК	ЖК	СК+ЖК
Количество некротизированных участков, % к контролю	2,9±0,85	1,16±0,38	0,93±0,41	0,85±0,27

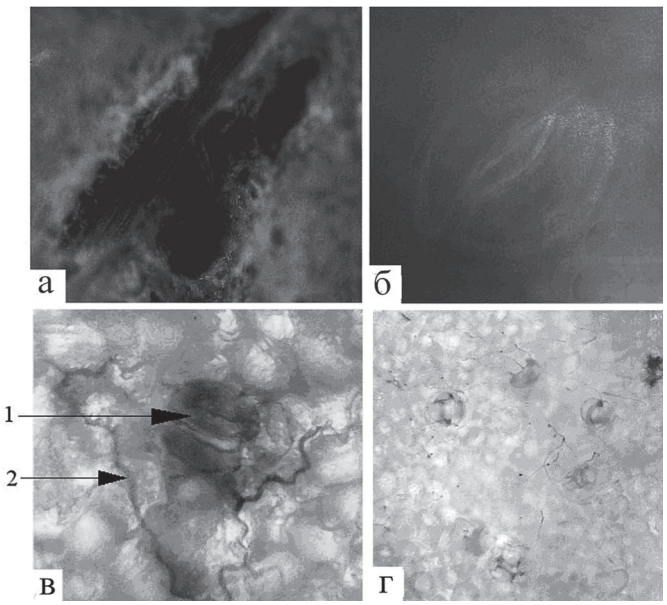


Рис. 1. Отложение лигнина вокруг области со сверхчувствительной реакцией (а); локализация лигнина (б) (увеличение ок. 12,5, об. 80), пероксидазной активности (в) (увеличение ок. 12,5, об. 40) и фенольных соединений (г) (увеличение ок. 12,5, об. 20) в апопласте замыкающих клеток устьиц инфицированного листа; 1 - замыкающие клетки устьиц; 2 - эпидермальная клетка.

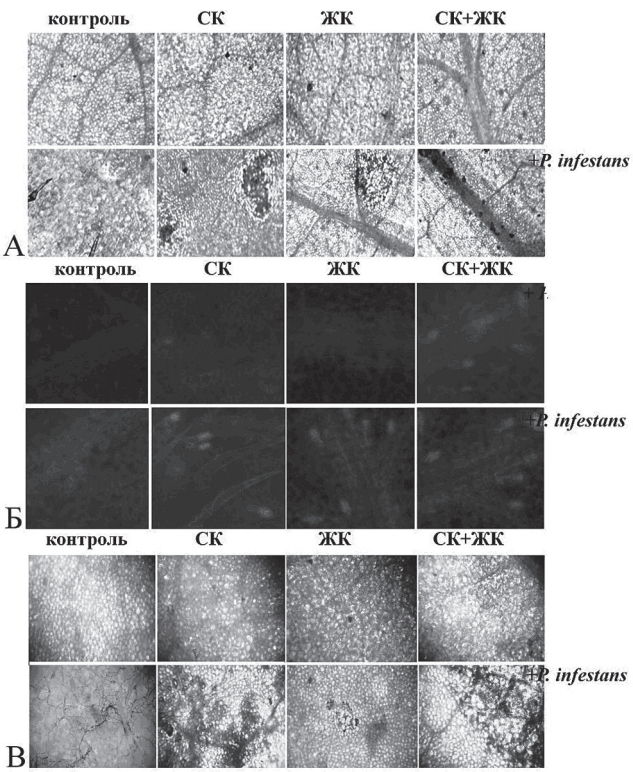


Рис. 2. Влияние регуляторов устойчивости на локальную активность пероксидаз (А) (увеличение об. 12,5, ок. 12,5), накопление лигнина (Б) (увеличение об. 20, ок. 10) и фенольных соединений (В) в листьях картофеля, в норме и при инфицировании *P. infestans* (увеличение об. 12,5, ок. 12,5).

Заключение

Таким образом, в наших экспериментах СК и ЖК проявляли синергетический эффект. Кроме того, их совместное действие приводило к накоплению фенольных соединений и лигнина в листьях, не подвергшихся воздействию патогена, что в остальных случаях имело место только в инфицированных растениях. Можно предположить, что в этом случае путем экзогенного добавления СК и ЖК был смоделирован сигнал о патогенной атаке, и, таким образом, эти сигнальные молекулы могут принимать совместное участие в формировании устойчивости, взаимно дополняя друг друга.

Работа выполнена при поддержке госконтракта Министерства образования и науки Российской федерации № П-339.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Turner J.G.*, *Ellis C.* The jasmonate signal pathway // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 153–164.

2. *Mur L.A.J.*, *Kenton P.*, *Atzorn R.*, *Mierch O.* The outcomes of concentration-speci c interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death // Plant Physiology. – 2006. – V. 140. – P. 249–262.

Sorokan A.V., Valeev A.Sh., Troshina N.B., Maksimov I.V.

REGULATION OF POTATO RESISTANCE TO THE LATE BLIGHT PATHOGEN *PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT) DE BARY BY SALICYLIC AND JASMONIC ACIDS

Institute of biochemistry and genetics, Ufa scientific center, Russia, fourtyanns@gmail.com

Summary. The influence of salicylic and jasmonic acid on the potato resistance to the late blight pathogen was tested. The cytological investigations of local peroxidase activity, fenolic compounds and lignin accumulation was provided.

Key words: salycilic acid, jasmonic acid, peroxidase, lignin.

УДК 615.462+615.847.8:615.849].015.8

Старикова Н.Н., Ситникова А.С., Быкова Л.П., Задорина И.И., Годовалов А.П., Косолапова Е.Ю.

ВЛИЯНИЕ ПЛОМБИРОВОЧНОГО МАТЕРИАЛА “РАДЕНТ” В СОЧЕТАНИИ С МАГНИТОЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ НА НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА *ESCHERICHIA COLI*

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, AGodovalov@gmail.com, Natashastarrr@mail.ru.

Резюме. Проведено изучение влияния пломбировочной пасты “Радент” на жизнеспособность *Escherichia coli* до и после воздействия на неё магнитолазерного излучения. Установлено, что такое сочетание физических факторов на культуры *E. coli* статистически значимо снижает количество живых микроорганизмов и повышает их чувствительность к препарату “Радент”. Использование сочетанного воздействия лазерного света и магнитного поля в комплексе лечебных мероприятий позволит получить выраженный антибактериальный эффект.

Ключевые слова: кальцийсодержащий материал “Радент”, магнитолазерное излучение, *Escherichia coli*.

Введение

Известно, что достичь состояния полной стерильности в корневых каналах зубов, используя традиционные методы эндодонтического лечения, не представляется возможным [1]. Одним из путей решения данной проблемы может быть использование комплекса медикаментозных и физических факторов. Антибактериальное действие лазерного излучения в настоящее время изучено достаточно хорошо и оценивается как высокое. Известно также, что лазерное излучение стимулирует процессы перекисного окисления липидов в мембранах клеток, что приводит к образованию свободных радикалов [2]. Полупроводниковые лазерные аппараты, благодаря своим компактным размерам, находят наибольшее применение в эндодонтии [3,4].

Цель исследования – изучить влияние пломбировочного препарата “Радент” на жизнеспособность *Escherichia coli* до и после воздействия на него лазерного света и магнитного поля.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 15 штаммах *E. coli*, выделенных у пациентов из корневых каналов зубов с хроническими формами апикального периодонтита. В работе использовали материал для временного пломбирования корневых каналов зубов “Радент” (ф. “Радуга Р”, Россия), который состоит из окиси цинка и гидроокиси кальция. Чувствительность микроорганизмов определяли путем прямого нанесения материала “Радент” на газонный посев инокулюма *E. coli*, который по плотности соответствует 0,5 стандарту Мак-Фарланда и содержит примерно $1{,}5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Пломбировочный материал наносили на посев в объеме 40 мкл. Учет результатов производили через 18-24 ч инкубации посевов при температуре +35°С. Результат исследования выражали в миллиметрах диаметра зоны задержки роста тестируемого штамма. При изучении сочетанного воздействия магнитолазерного излучения использовали лазерный аппарат с полупроводниковым излучателем на арсениде галлия “Оптодан” (НПП “Венд”, Россия); длина волны лазерного излучения 0,85-0,98 мкм; магнитная индукция не менее 50 мТл. Инокулюм *E.coli* делили на две порции. Первую облучали лазерным светом аппарата “Оптодан” в течение 2 мин на расстоянии 1 см в стерильной чашке Петри, вторую – выдерживали в течение 2 мин в стерильной чашке Петри без воздействия лазерного света. После этого осуществляли газонный посев обеих частей инокулюма на чашки Петри; определение чувствительности тест-штаммов к пломбировочному материалу проводили по той же методике. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований установлено, что диаметр зоны задержки роста *E. coli* вокруг препарата “Радент” составляет 15,3±2,6 мм. После сочетанного воздействия магнитолазерного излучения на культуры *E. coli* их чувствительность к препарату “Радент” статистически значимо повышалась. Так, зона задержки роста для облученных культур составила 21,7±1,5 мм ($P<0{,}05$). Такое воздействие указанных физических факторов можно объяснить их способностью снижать число жизнеспособных бактериальных клеток. В проведенных нами исследовании показано, что воздействие лазерного излучения и магнитного поля статистически значимо снижает количество живых *E. coli* ($P<0{,}05$; таблица). Следовательно, при использовании пломбировочного материала сочетанного в сочетании с воздействием лазерного излучения и магнитного поля происходит суммация антибактериальных эффектов физических и химических факторов.

Таблица.

Влияние сочетанного воздействия лазерного света и магнитного поля на жизнеспособность *E. coli*

Тест-штамм	Количество колониеобразующих единиц	
	без воздействия магнитолазерного излучения	при действии магнитолазерного излучения
Escherichia coli	0,5835±0,1383	0,8125±0,1971

Примечание. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) представлено в виде десятичного логарифма числа КОЕ.

Заключение

Таким образом, использование сочетанного воздействия пломбировочного материала, содержащего гидроксид кальция, и магнитолазерного излучения в клинических условиях при лечении хронических форм апикального периодонтита позволяет получить выраженный антибактериальный эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ясникова Е.А., Янушевич О.О., Ордовский-Тамаевский В.В., Царев В.Н., Гринин В.М.* Микробиоценоз системы корневых каналов при лечении острого верхушечного периодонтита / Образование, наука и практика в стоматологии // Сб. трудов 3 Всерос. науч.-практ. конф. – Москва, 2006. – С. 239–240.

2. *Matouni J., Tang Y., Wu M., Vlahovic B., Yang L.* Single-walled carbon nanotubes coupled with near-infrared laser for inactivation of bacterial cells // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2011. – V. 11. N. 6. – P. 4708–4716.

3. *Kuvvetli S.S., Sandalli N., Topcuoglu N., Kulekci G.* Antibacterial efficacy of diode and Er:YAG laser irradiation in experimentally contaminated primary molar root canals // J. Clin. Pediatr. Dent. – 2009. – V. 34. N. 1. – P. 43–48.

4. *Косолапова Е.Ю.* Оптимизация методов лечения хронических форм апикального периодонтита / Е.Ю. Косолапова: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Пермь, 2010. – 22 с.

Starikova N.N., Sitnikova A.S., Bykova L.P., Zadorina I.I., Godovalov A.P., Kosolapova E.Iu.

THE STUDY OF THE INFLUENCE OF THE FILLING MATERIAL "RADENT" AND THE COMBINED INTERVENTION OF LASER LIGHT AND MAGNETIC FIELD ON SOME PROPERTIS OF *ESCHERICHIA COLI*

Academician E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, AGodovalov@gmail.com; Natashastarrr@mail.ru.

Summary. The study of the influence of paste "Radent" on the viability of *Escherichia coli* before and after exposure in laser light and magnetic fields. It is established, that the combined effect of laser radiation and magnetic field on the isolate *E. coli* statistically significantly increases their sensitivity to the medication "Radent". In our studies it has shown, that exposure of laser radiation and magnetic field statistically significantly reduces the number of vital *E. coli*. The use of combined influence of laser light and magnetic field in the complex of medical actions will allow getting an apparent antibacterial effect.

Key words: calcium-containing materials "Radent", laser radiation and magnetic field, *Escherichia coli*.

УДК 581.557–581.056+502.75

Шаравин Д.Ю., Ковалевская Н.П.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, dima-sharavin@yandex.ru

Резюме. В работе исследованы особенности взаимодействия растений и ассоциаций азотфиксирующих метилотрофных бактерий в условиях солевого стресса. При солевом стрессе в несколько раз повышается интенсивность синтеза каротиноидов и хлорофиллов в листовой части растений, проростки которых предварительно были обработаны галотолерантными метилотрофными бактериями.

Ключевые слова: метилотрофные бактерии, симбиоз пигменты, азотфиксация.

Введение

Метан, метанол, метиламины и метилсернистые соединения являются естественными продуктами метаболизма растений [1]. Используя C_1-метаболиты растений в качестве источников углерода и энергии, метилотрофные бактерии влияют на рост и развитие растений путем секреции биоактивных соединений – витаминов и фитогормонов (ауксинов, цитокининов) [2]. Метилотрофы, стимулирующие рост и развитие растений, перспективны для практического применения в биотехнологии защиты растений. Известно, что повышенные концентрации соли в почве влияют на процессы фотосинтеза, нарушая структуру хлоропластов, тормозя синтез фотосинтетических ферментов и пигментов, а также вызывая дефицит CO_2 из-за закрывания устьиц. Цель настоящей работы – исследование влияния галотолерантных метилотрофных бактерий на развитие растений пшеницы в условиях солевого стресса.

Материалы и методы исследования

Из образцов техногенных засоленных почв, отобранных вблизи г. Соликамска, получали накопительные культуры метилотрофов, инкубируя образцы в жидкой и на агаризованной среде "П", разработанной В.Ф. Гальченко [3] с 2% метанола и 5% NaCl, но без добавления солей азота. Для колонизации растений использовали суспензии клеток накопительных культур в середине логарифмической фазы роста ($ОП_{590}$=0,4–0,6). Почвы и растворы стерилизовали автоклавированием. Семена пшеницы обрабатывали 0,5% раствором $KMnO_4$, переносили в чашки Петри и добавляли 15 мл воды. 3х-дневные проростки смачивали бактериальной суспензией и помещали в стерильную почву, обработанную 0,5 и 1% NaCl, на глубину 1 см, или проводили проращивание в стерильных флаконах с 1 мл 0,5 и 1% NaCl. Численность галотолерантных азотфиксирующих метилотрофов на листовой поверхности и в прикорневой зоне проростков определяли методом высева на безазотистую агаризованную среду "П" и последующим подсчетом колоний (КОЕ). В качестве контроля использовали проростки, неинокулированные бактериями. Спектры пигментов пшеницы в этанольных вытяжках регистрировали спектрофотометром UV mini-1240 Shimadzu.

Результаты и обсуждение

В ризосфере и филлосфере 14-дневных проростков пшеницы, выращенных в засоленной почве или солевом растворе, обнаружены галотолерантные азотфиксирующие метилотрофы. Количество метилотрофных бактерий на 1 см^2 листовой части и корней одного проростка варьировало (500–1100 КОЕ в филлосфере и 100–300 КОЕ в ризосфере). Проростки семян, обработанных бактериальной суспензией, развивались значительно быстрее, чем в контроле, характеризовались увеличением массы и усилением ветвления корней. Считается, что эти изменения корневой системы растений индуцируются фитогормонами, продуцируемыми бактериями: индолилуксусной кислотой, цитокининами и гиббериллинами [2]. Выявлены различия в динамике содержания фотосинтетических пигментов листовой части проростков пшеницы, обработанных различными накопительными культурами и развивающихся при солености 0,5% или 1% NaCl (табл. 1).

Таблица 1.

Общее содержание пигментов в листьях проростков пшеницы, колонизированных метилотрофными бактериями (мг/г сырой массы)

Накопительные культуры	Варианты* % NaCl	3 ч	3 сут	6 сут
Контроль	0,5 1	0,14 ± 0,08 0,13 ± 0,05	0,70 ± 0,04 0,46 ± 0,06	0,62 ± 0,04 0,54 ± 0,03
12П	0,5 1	0,52 ± 0,05 0,15 ± 0,03	0,94 ± 0,05 0,35 ± 0,04	0,55 ± 0,05 0,67 ± 0,03
18П	0,5 1	0,14 ± 0,04 0,32 ± 0,05	0,47 ± 0,07 0,32 ± 0,06	0,88 ± 0,05 0,45 ± 0,04
20П	0,5 1	0,33 ± 0,03 0,17 ± 0,05	0,85 ± 0,04 0,26 ± 0,04	0,76 ± 0,05 0,38 ± 0,04

Примечание. * Проращивание пшеницы проводили в солевом растворе.

Через 3 ч инкубации в присутствии 0,5% NaCl в проростках семян, инокулированных ассоциациями №12П и №20П, общее содержание пигментов в 3,71 и 2,29 раза превышало таковое у контрольного варианта. На последующих этапах развития (на 3 и 6 сут) превышение концентрации пигментов у этой серии проростков над контролем постепенно снижалось. В экспериментах с более высокой концентрацией соли (1% NaCl) через 3-6 суток происходило постепенное повышение концентрации пигментов как в контрольных, так и опытных вариантах, причем у инкубируемых в солевом растворе проростков содержание пигментов было ниже.

Анализ спектров поглощения этанольных экстрактов пшеницы выявил, что в случае обработки семян культурами №12П, 18П или 20П, в проростках, инкубированных в течение 3 ч при 0,5% NaCl, наряду с хлорофиллом синтезировались пигменты с пиками поглощения при λ=612/618 нм, а также каротиноид с λ=375 нм (№20П). Пигмент, имеющий пик поглощения при 618 нм, был зафиксирован в контрольных вариантах только через 3 сут развития в присутствии 0,5 и 1% NaCl, но не обнаружен в проростках, обработанных №12П и №20П и инкубированных 3 ч в присутствии 1% NaCl.

Выводы

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что обработка семян пшеницы препаратами галотолерантных метилотрофов способствует более быстрой адаптации растения к умеренному солевому стрессу, предположительно стимулируя в проростках синтез фотосинтетических систем и снабжая фитогормонами.

Работа выполнена при поддержке гранта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (номер гос. регистрации 01200963684).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Keppler F., Hamilton J.T.G., McRoberts W.C, Vigano I., Brass M., Ruckmann T.* Methoxyl groups of plant pectin as a precursor of atmospheric methane: evidence from deuterium labelling studies // New Phytologist. – 2008. – V. 178. – P. 808–814.
2. *Троценко Ю.А., Иванова Е.Г., Доронина Н.В.* Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты // Микробиология. – 2001. – Т. 70 (6). – С. 725–736.
3. *Гальченко В.Ф.* Метанотрофные бактерии. – М.: ГЕОС, 2001. – 500 с.

Sharavin D.Ju., Kovalevskaya N.P.

METHYLOTROPHIC BACTERIA INTERACTION WITH PLANTS UNDER SALT STRESS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia, dima-sharavin@yandex.ru

Summary. Peculiarities in interaction of associations of nitrogen-fixing methylotrophic bacteria with plant under salt stress were analyzed. The carotinoid and chlorophyll synthesis in leafs from those plants which seeds were pre-treated with halotolerant methylotrophic bacteria was intensified by multi-fold under the salt stress.

Key words: methylotrophic bacteria, symbiosis, pigments, nitrogen-fixation.

УДК 616.98:579.834.114-97

Шкода О.С., Фоменко Н.В., Чикова Е.Д., Морозкин Е.С., Милейко В. А., Власов В.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю.

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ цирДНК В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИКСОДОВОМ КЛЕЩЕВОМ БОРРЕЛИОЗЕ

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия, olgashkoda@sibmail.com

Резюме. В настоящей работе проведен сравнительный анализ концентрации внеклеточных ДНК, циркулирующих в плазме крови (цирДНК) и связанных с поверхностью клеток крови (спк-цирДНК) у здоровых доноров (n=60) и больных ИКБ (n=61). Показано, что концентрация цирДНК и скп-цирДНК достоверно возрастает при ИКБ, зависит от формы заболевания и ассоциирована с развитием специфического гуморального иммунного ответа. В группе больных, имеющих специфические антитела к антигенам *Borrelia burgdorferi sensu lato*, увеличена концентрация спк-цирДНК по сравнению с больными без антител. У больных с безэритемной формой концентрация цирДНК повышена по сравнению с больными с эритемной формой. Полученные данные говорят о перспективности дальнейшего изучения цирДНК крови в качестве дополнительного диагностического критерия развития ИКБ при безэритемных формах его течения.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, внеклеточные ДНК, циркулирующие в крови, гуморальный иммунный ответ.

Введение

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) характеризуется различными формами развития и опасен тем, что его хроническое течение может вызывать осложнения, такие как аутоиммунные патологии. Ранее показано, что внеклеточные ДНК, циркулирующие в крови (цирДНК), присутствуют в норме в невысоких концентрациях, тогда как их количество и состав изменяются при онкологических и аутоиммунных патологиях. В настоящей работе проведен анализ изменения концентрации цирДНК в норме и при различных формах ИКБ и оценена значимость выявленных изменений как дополнительных факторов для диагностики.

Материалы и методы исследования

В исследование включены образцы крови 60 здоровых лиц, отрицавших факт присасывания клеща в последние 3 года, и 61 пациент, поступивший в Городскую инфекционную клиническую больницу №1 г. Новосибирска с признаками инфекционного заболевания и последующим диагнозом ИКБ. Проведено определение титра антител классов IgG и IgM к АГ боррелий методом ИФА и концентрации цирДНК крови методом количественной ПЦР в режиме реального времени, специфичной к фрагментам повторяющихся последовательностей LINE-1, как описано ранее [1].

Результаты и обсуждение

Показано, что общая группа больных с диагнозом ИКБ (как с МЭ, так и без МЭ) достоверно отличалась по концентрации циркулирующих в крови скп-цирДНК от здоровых лиц (98,5±14,5 и 13,4±4,1 нг/мл соответственно) ($p<0,0001$, критерий Манна-Уитни). Выявлено достоверное увеличение концентрации скп-цирДНК у больных с безэритемной формой ИКБ (n=13) по сравнению с эритемной формой ИКБ (n=48) (195,4±47,2 и 72,2±10,8 нг/мл соответственно, $p<0,05$). В плазме крови уровень цирДНК также достоверно увеличен в группе с безэритемной формой ИКБ относительно пациентов с эритемной формой (19,4±8,0 и 7,4±2,5 соответственно, $p<0,05$). При этом не выявлено достоверного увеличения концентрации цирДНК плазмы больных с эритемной формой по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,61$).

Больные с ИКБ были разделены на две группы по наличию в плазме крови противоборрелиозных антител. Обнаружено, что среднее значение концентрации скп-цирДНК в группе больных с ИКБ, имеющих специфические антитела к АГ боррелий (n=27), достоверно превышало значение концентрации у больных без выявленных противоборрелиозных антител (n=34) (130,2±21,7 и 71,7±18,7 нг/мл соответственно, $p<0,05$) (рисунок). В плазме крови не выявлено достоверных различий между этими группами. Таким образом, развитие специфического гуморального иммунного ответа на боррелиозную инфекцию достоверно ассоциировано с увеличением концентрации скп-цирДНК крови.

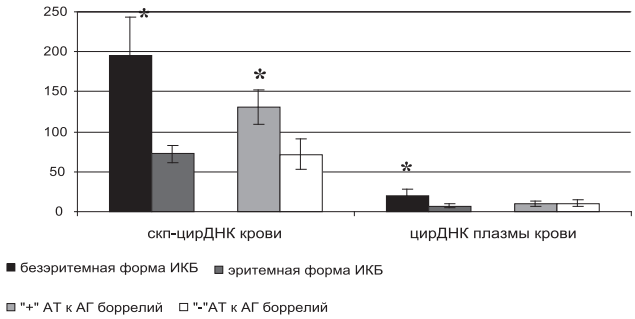


Рисунок. Концентрация цирДНК в крови больных с ИКБ (нг/мл) (*при p<0,05, критерий Манна-Уитни).

Заключение

В настоящей работе впервые показано достоверное увеличение концентрации цирДНК крови при развитии ИКБ, интенсивность которого коррелирует с развитием специфического антибактериального гуморального иммунного ответа и с отсутствием неспецифической воспалительной реакции (МЭ) при ИКБ. Полученные данные говорят о перспективности дальнейшего изучения цирДНК крови как дополнительного фактора, применимого для диагностики, и возможно, принимающего участие в патогенезе ИКБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V.* Concentration and distribution of single-copy β-actin gene and LINE-1 repetitive elements in blood of lung cancer patients // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, Ed. Gahan P. – 2011. – Part 2. – P. 41–45.

Shkoda O.S., Fomenko N.V., Chikova E.D., Morozkin E.S., Mileiko V.A., Vlassov V.V., Lactionov P.P., Rykova E.Y.

CIRDNA CONCENTRATION CHANGES IN LYME BORRELIOSIS PATIENT BLOOD DURING THE ANTIBODY RESPONSE DEVELOPMENT

Institute of chemical biology and Fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia, olgashkoda@sibmail.com.

Summary. Concentration was estimated of the extracellular DNA circulating in the blood plasma (cirDNA) or bound to blood cell surface (csb-cirDNA) from healthy subjects and patients with Lyme borreliosis. Blood samples from healthy donors (n=60) and patients with Lyme borreliosis (n=61) were included into the study. Elevation of the csb-cirDNA concentration was found to be elevated in patients compared with healthy subjects. Concentration increase was significantly associated with the development of the antibodies specific to *Borrelia burgdorferi* s.l. CirDNA concentration was found to be significantly higher in patients without erythema compared with patients, in which erythema was observed. The data obtained indicate that further study of the cirDNA concentration is promising to evaluate its applicability as the additional diagnostic factor in the Lyme borreliosis pathogenesis.

Key words: Lyme borreliosis, circulating DNA, antibody response.

УДК 577.15: 571.27

Шпирная И.А., Цветков В.О., Басырова А.М., Фостий З.А., Ибрагимов Р.И.

ДИФФУЗИЯ ИНГИБИТОРОВ ПЕКТИНАЗЫ *ASPERGILLUS NIGER* ИЗ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ЗЛАКОВ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Башкирский государственный университет”, г. Уфа, Россия, i-shia@yandex.ru

Резюме. Показано, что в покоящихся семенах и диффузатах пшеницы, ржи и овса присутствуют соединения, эффективно ингибирующие активность пектиназы *Aspergillus niger*. Белки-ингибиторы фермента из семян активно диффундируют в окружающую среду уже в первые часы набухания и выявляются в диффузатах на более поздних стадиях прорастания.

Ключевые слова: фитопатогенные микроорганизмы, ингибиторы пектиназы, диффузия, устойчивость растений.

Введение

Процесс инфицирования растений связан с секрецией патогенными микроорганизмами комплекса внеклеточных ферментов, обеспечивающих расщепление и усвоение полимеров растительных тканей. Особенно эффективными “орудиями агрессивности” являются протеиназы и ферменты карбогидразного комплекса – амилазы, пектиназы и целлюлазы [1]. Также известно, что в семенах и вегетативных органах растений содержатся защитные белки, подавляющие активность внеклеточных гидролаз патогенов [2, 3]. Важным аргументом в пользу защитной роли этих молекул является факт диффузии их из прорастающих семян в окружающую среду. Наиболее изученными в этом плане являются ингибиторы протеиназ и амилаз [4, 5]. Сведения о диффузии соединений, ингибирующих активность других гидролаз, в частности, пектиназ, отсутствуют. Соответственно, исследования в этом направлении являются актуальными.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили семена яровой пшеницы (Саратовская 55), озимой ржи (линия 46 Д-18), овса (Стригунок). Для получения экстрактов навеску сухих семян (1 г) гомогенизировали и экстрагировали охлажденной дистиллированной водой (5 мл) в течение 2 ч. Центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. В супернатанте определяли активность свободных и связанных ингибиторов [6]. Для получения диффузатов простерилизованные семена помещали в чашки Петри, заливали дистиллированной водой (1:5), инкубировали при 30^{0}С от 3 до 60 ч. В диффузатах определяли содержание белка по Бредфорду и активность ингибиторов пектиназы *Aspergillus niger* (Sigma, США) по гидролизу яблочного пектина в агарозном геле [7].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов в семенах злаков выявлена активность ингибиторов экзогенной пектиназы: наибольшей активностью свободных ингибиторов характеризовались семена овса (18,92±0,68 ИЕ/г массы) и ржи (16,63±0,64 ИЕ/г массы).

Известно, что ингибиторы протеиназ в растительных тканях могут находиться в свободном (активном) или связанном (в составе комплекса с протеиназами растений) состояниях [6]. Возможно, что в семенах злаков ингибиторы пектиназ также могут образовывать подобные комплексы. Как показали наши эксперименты, при прогревании экстрактов семян пшеницы и ржи уровень активности ингибиторов пектиназы в них возрастал в 2 раза. Это факт свидетельствует о том, что часть ингибиторов находится в составе комплекса с ферментом, часть – в свободном состоянии.

Как видно из рисунка, белки, подавляющие активность пектиназы, выявлялись в диффузатах прорастающих семян уже в первые часы инкубации семян. В среднем активность ингибиторов пектиназы в диффузатах составила: для семян пшеницы – 38,1; ржи – 32,4; овса – 48,5 ИЕ/мг белка.

Таким образом, в покоящихся семенах злаков выявлены белки-ингибиторы, подавляющие активность пектиназы патогенного грибка *Aspergillus niger*. Аналогичная активность обнаружена также и в инкубационной среде, что свидетельствует об активной диффузии этих молекул из семян в процессе их прорастания. Вероятно, что ингибиторы экзогенных пектиназ, наряду с другими специфическими защитными молекулами [8], участву-

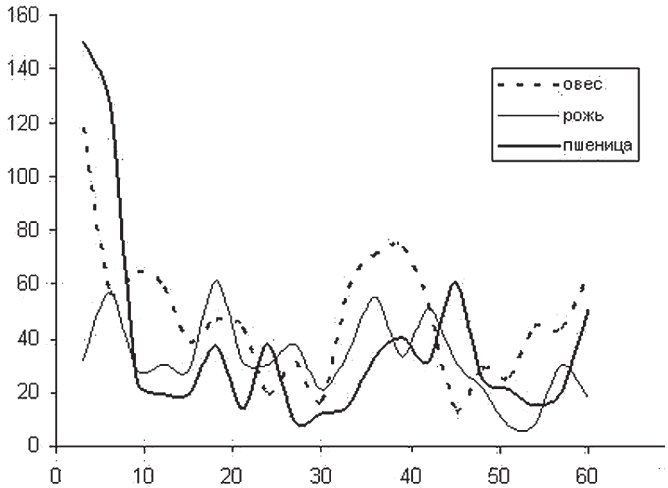


Рисунок. Динамика активности ингибиторов пектиназы *A. niger* в диффузатах в процессе инкубации семян в среде прорастания. По оси абсцисс - время инкубации семян, час; по оси ординат - активность ингибиторов пектиназы ИЕ/мг белка

ют в создании среды с антимикробными свойствами вокруг прорастающих семян.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы (ГК № 16.740.110061); ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (ГК № 16.512.11.2014).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кретович В.Л.* Биохимия растений. – М.: Высшая школа. – 1986. – С.503.

2. *Мосолов В.В., Валуева Т.А.* Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. № 3. – С. 261–282.

3. *Конарев А.В.* Системы ингибиторов гидролаз у злаков - организация, функции и эволюционная изменчивость // Автореф. дисс. докт. биол. наук. – Москва, 1992. – 38 с.

4. *Кладницкая Г.В., Валуева Т.А., Ермолова Н.В.* Накопление ингибиторов протеиназ в диффузатах клубней картофеля при инфицировании возбудителем фитофтороза // Физиол. растений. – 1996. – Т. 43. № 5. – 701–706.

5. *Wilson K.A.* The release of proteinase inhibitors from legume seeds during germination // Phytochemistry. – 1980. – V. 19. № 12. – P. 2517–2519.

6. *Ибрагимов Р.И., Яковлев В.Г., Ахметов Р.Р.* Определение активности ингибиторов в составе комплекса с протеиназой // Физиология и биохимия культурных растений. – 1987. – № 1. – С. 51–54.

7. *Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И.* Определение активности гидролаз и их ингибиторов по гидролизу субстрата в геле агарозы // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. № 4. – С. 497–501.

8. *Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И.* Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. – Уфа: Гилем, 2006. – 232 с.

Shpirnaya I.A., Tsvetkov V.O., Basyrova A.M., Fostiy Z.A., Ibragimov R.I.

DIFFUSION OF INHIBITORS OF *A. NIGER* PECTINASE FROM GERMINATING SEEDS OF CEREALS

Bashkir State University, Ufa, Russia, i-shia@yandex.ru

Summary. It's shown, that there are substances being effectively inhibitory against the activity of *Aspergillus niger* pectinase in stationary seeds and diffusates of wheat, rye and oat. An inhibitory protein from seeds actively diffuses in environment within the first few hours of swelling and can be detected in diffusates at later stages of germination as well.

Key words: phytopathogenic microorganisms, pectinase inhibitors, diffusion, plant resistance.

УДК 571.2

Бабаев А.А., Старкова Д.В., Патрина А.М., Копылова Г.Е., Новиков В.В.

СЫВОРОТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образовнаия “Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского”, г. Нижний Новгород, Россия, alexisbabaev@list.ru

Резюме. Молекулы адгезии группы ICAM (CD54, CD50) и LFA-1 (CD11a/CD18) участвуют в центральном событии адаптивного иммунного ответа – антигенпрезентации. Нами было показано существование растворимых комплексов этих молекул. Целью данного исследования явилась оценка сывороточного уровня растворимых комплексов CD18-CD54, CD18-CD50 и суммарного содержания растворимых молекул CD54, CD50 и CD18 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями (ревматоидный артрит, системная красная волчанка) с помощью иммуноферментного анализа. Было показано увеличение сывороточной концентрации растворимых молекул CD54, CD50 и CD18 при аутоиммунных заболеваниях в сравнении со здоровыми донорами. Содержание растворимых ассоциатов CD18-CD54 и CD18-CD50 не менялось.

Ключевые слова: молекулы адгезии, растворимые формы, аутоиммунные заболевания.

Введение

По данным литературы одним из факторов поражения при аутоиммунных заболеваниях является Т-клеточный иммунитет. Т-клетки инициируют локальное воспаление в суставной полости с вовлечением в процесс макрофагов. Продуцируемые макрофагами факторы играют ведущую роль в формировании локального поражения, в том числе гиперплазии синовиальной оболочки и повреждении хряща. При этом показано увеличение концентрации молекул адгезии в синовиальной жидкости и их участие в процессе воспаления.

Пул растворимых дифференцировочных молекул, в том числе и молекул адгезии, тесно связан с работой многих компонентов глобальной иммунологической сети. Так, в формировании иммунологического синапса участвуют β_2-интегрин LFA-1 (CD11a/CD18) и белок адгезии ICAM-1 (CD54). В инициации первичного иммунного ответа принимает участие молекула адгезии ICAM-3 (CD50).

В норме белки крови, и в том числе растворимые формы дифференцировочных молекул, находятся в равновесном состоянии. Изменение концентрации той или иной формы растворимого белка влечет за собой нарушение гомеостатического равновесия организма. Исследование спектра структурно функциональных форм растворимых дифференцировочных молекул может быть использовано в качестве дополнительного критерия в мониторинге различных заболеваний.

Материалы и методы исследования

В работе использовали сыворотки крови 80 здоровых доноров, образцы сыворотки крови 40 больных ревматоидным артритом и 24 больных системной красной волчанкой (СКВ). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Основным методом исследования являлся твердофазный иммуноферментный анализ.

Результаты и обсуждение

Определение сывороточного уровня растворимых CD18 молекул выявило его увеличение при ревматоидном артрите в 1,2 раза, а при СКВ в 1,6 раза. При разделении больных ревматоидным артритом на группы в соответствии с концентрацией аутоантител было установлено, что в группе с концентрацией аутоантител > 1000 Ед/мл сывороточное содержание CD18 молекул в 1,4 раза выше, чем в подгруппе с содержанием аутоантител < 100 ед/мл.

У больных ревматоидным артритом сывороточное содержание суммарной фракции растворимых CD50 молекул возрастало в 2,9 раза, а при СКВ – в 3,5 раза. Сывороточный уровень олигомерной фракции растворимых CD50 молекул увеличивался в 11 раз при аутоиммунных заболеваниях. Относительная концентрация олигомерных CD50 молекул в подгруппе с уровнем аутоантител > 1000 Ед/мл выше в 2,3 раза, чем в подгруппе с уровнем аутоантител < 100 Ед/мл.

Иностранные исследователи также отмечают повышение сывороточного уровня растворимых CD50 молекул при аутоиммунных заболеваниях. Концентрация растворимых CD50 молекул повышается не только в сыворотке, но и в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом. Содержание растворимых CD50 молекул у больных СКВ особенно значительно возрастает при активных формах заболевания.

Сывороточное содержание суммарной фракции растворимых CD54 молекул возрастало в 1,2 раза при ревматоидном артрите, а при СКВ данный показатель увеличивался в 1,4 раза. При ревматоидном артрите сывороточный уровень олигомерной фракции растворимых CD54 молекул уменьшался в 1,2 раза, при СКВ – в 1,1 раза. При этом было установлено, что в подгруппе с концентрацией аутоантител > 1000 Ед/мл сывороточное содержание олигомерных CD54 молекул изменяется незначительно - в 1,1 в отличие от подгруппы с содержанием аутоантител< 100 Ед/мл.

У больных ревматоидным артритом сывороточный уровень растворимых ассоциатов CD18-CD54 уменьшался, а при заболевании СКВ сохранялся относительно нормы. Сывороточное содержание растворимых комплексов молекул CD18-CD50 при аутоиммунных заболеваниях сохранялось в пределах нормы.

Сывороточный уровень комплексов CD18-CD50 у женщин, больных СКВ, увеличивался в 1,3 раза по сравнению с нормой. У больных с содержанием антител к днДНК < 200 ед/мл концентрация CD18-CD50 увеличивалась в 1,2 раза, а с содержанием аутоантител > 200 ед/мл - в 1,6 раза по сравнению с показателями здоровых доноров. По данным литературы около 90% страдающих СКВ – женщины.

Уровень растворимых комплексов CD18-CD50 в подгруппе мужчин, больных ревматоидным артритом, уменьшался в 1,2 раза по сравнению с нормой. В подгруппе больных с содержанием аутоантител < 100 ед/мл установлено уменьшение концентрации комплексов CD18-CD50 в 1,1 раза, в подгруппе с уровнем аутоантител от 100 до 1000 ед/мл – снижение в 1,3 раза, а с уровнем аутоантител > 1000 ед/мл – снижение в 1,4 раза по сравнению с нормой.

Babaev A.A., Starkova D.V., Patrina A.M., Kopylova G.E., Novikov V.V.

SERUM ADHESION MOLECULE LEVEL UNDER AUTOIMMUNE DISEASES

N.I. Lobachevsky University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia, alexisbabaev@list.ru

Summary. Adhesion molecules are known to be involved in key event of the adaptive immune response – antigen presentation. These include the molecules of ICAM (CD54, CD50) and LFA-1 (CD11a/CD18). We have shown that serum contains soluble complexes of these molecules – CD18-CD54 and CD18-CD50. The purpose of this study was to evaluate serum levels of soluble complexes of CD18-CD54, CD18-CD50, and total fraction of soluble proteins CD54, CD50 and CD18 in patients with autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus). The content of soluble molecules was determined by solid-phase ELISA. The content of soluble CD54, CD50, CD18 molecules was increased in the serum of patients with autoimmune diseases as compared with controls. Serum contents of CD50 oligomers in the blood of patients had more normal values and CD54 oligomers had less normal values. Levels of associates of CD18-CD54 and CD18-CD50 in the serum of patients and healthy donors had no significant differences.

Key words: adhesion molecules, soluble forms, autoimmune diseases.

УДК 612.017.1:612.444

Бочкова М.С., Бахметьев Б.А., Ширшев С.В.

ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА ВТОРИЧНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ, РЕАКЦИЮ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, krasnykh-m@mail.ru

Резюме. Введение экзогенного тироксина (T_4) сенсибилизированным животным сопровождается разнонаправленными изменениями в формировании вторичного гуморального иммунного ответа и реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Дозозависимо стимулируя IgG-антителопродуценты и не оказывая влияния на реакцию ГЗТ, гормон тем самым создает условия поляризации иммунных реакций в сторону Th2-типа. На фоне выраженной стимуляции вторичного гуморального ответа T_4 повышает число ядросодержащих клеток (ЯСК) в перитонеальной полости за счет макрофагов при одновременном снижении в циркуляции количества моноцитов способных к фагоцитозу.

Ключевые слова: тироксин; вторичный гуморальный иммунный ответ; гиперчувствительность замедленного типа; фагоцитарная активность.

Введение

Иммунная система организма находится под контролем нейроэндокринной регуляции, среди элементов которой одно из ведущих мест занимают гормоны щитовидной железы [1]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлено, что трийодтиронин и тироксин способны изменять реакции как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Показано их стимулирующее действие на антителогенез и реакцию ГЗТ [2]. В немногочисленных работах, посвященных анализу влияния T_4 на функции фагоцитирующих клеток, выявлена разнонаправленность его действия на поглотительную активность интактных лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов [3, 4]. Вместе с тем, влияние T_4 на активность отдельных популяций лейкоцитов, способных к фагоцитозу, у иммунизированных животных до настоящего времени не исследовано. Комплексный анализ эффектов экзогенного T_4 на уровне одного и того же организма с одновременной регистрацией реакций врожденного и адаптивного иммунитета не проводился.

Цель данного исследования - комплексный анализ эффектов T_4 на формирование вторичного гуморального иммунного ответа, реакцию ГЗТ с одновременной оценкой поглотительной активности лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на мышах-самцах породы Swiss. Экзогенный T_4 вводили подкожно в суточных дозах 0,04 мг/кг, или 40 мг/кг. Выбранные дозы гормона моделировали состояние экспериментального гипертиреоза. В качестве контроля использовали инъекции растворителя гормона с добавлением физиологического раствора (0,1Н NaOH).

Для оценки влияния T_4 на вторичный иммунный ответ животных двукратно внутрибрюшинно иммунизировали 10^8 эритроцитов барана (ЭБ) с интервалом в 20 сут. Для проявления реакции ГЗТ через 4 дня после вторичной иммунизации под апоневроз стопы мышей вводили 5Ч10^7 ЭБ. Результаты ГЗТ учитывали через 24 ч, измеряя толщину контрольной и сенсибилизированной стопы с помощью микрометра. Разница в толщине характеризовала выраженность ГЗТ. Учет вторичного иммунного ответа проводили по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке непрямым методом Ерне в модификации. Для этого использовали предварительно оттитрованную антисыворотку кролика против IgG мыши в разведении 1:200. Регистрировали число IgM и IgG-АОК в селезенке. T_4 вводили в течение 5 дней до и 5 дней после внутрибрюшинной реиммунизации. Одновременно с оценкой иммунного ответа у этих же животных подсчитывали количество ЯСК в крови, селезенке, перитонеальной полости и исследовали фагоцитарную активность лейкоцитов крови, перитонеальных макрофагов по поглощению формалинизированных ЭБ.

Результаты и обсуждение

Инъекции T_4 дозозависимо повышали численность IgG-АОК в селезенке, при этом не влияли на генерацию IgM-АОК и на численность ЯСК в этом органе (таблица). Анализ реакции ГЗТ у этих же животных не выявил статистически значимых изменений в ее выраженности. На общее число ЯСК крови гормон не оказал влияния, однако введение высокой дозы T_4 (40 мг/кг) приводило к увеличению количества нейтрофилов крови при одновременном снижении числа моноцитов. Параллельно, инъекции T_4 в дозе 0,04 мг/кг повышали численность ЯСК в перитонеальной полости, а с увеличением дозы гормона (40 мг/кг) этот эффект отменялся. Вероятно, увеличение клеточности в перитонеальной полости связано с усилением антигенной нагрузки на этот орган. Не изменяя общую фагоцитарную активность лейкоцитов крови, T_4, с увеличением дозы избирательно угнетал поглотительную способность популяции моноцитов.

По-видимому, переключение иммунного ответа в сторону гуморального и угнетение фагоцитарной активности моноцитов связано не только с прямым действием T_4, но и опосредовано эффектами глюкокортикоидов, концентрация которых модифицируется при экспериментальном гипертиреозе [5]. Поскольку тиреоидные гормоны повышают количество лимфоцитов в циркуляции, в отличие от глюкокортикоидов, которые, напротив, стимулируют выход сегментоядерных нейтрофилов в кровь, выявленное повышение числа нейтрофилов в кровотоке при введении T_4 в высокой дозе (40 мг/кг) очевидно связано в большей степени с эффектами данных гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнева Е.А., Шхинек. Э.К. Гормоны и иммунная система. – Л.: Наука, 1988. – 251 с.

2. Williamson R.A., Davison T.F., Payne L.N. Effects of thyroid hormones on humoral and cell-mediated immune responses in the domestic fowl (gallus domesticus) // Dev. Comp. Immunol. – 1990. – V. 14. – № 3. – P. 305–318.

3. Hrycek A., Kalina Z. Evaluation of the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in patients with hyperthyroidism // Endokrinol. Pol. – 1989. – V. 40. № 1. – P.15–24.

4. Forner M.A., Barriga C., Ortega E. Exercise-induced simulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine // J. Appl. Physiol. – 1996. – V. 80. № 3. – P. 899–903.

5. Ланин Д.В. Адренергические механизмы в регуляции функций фагоцитирующих клеток глюкокортикоидами и тироксином: Автореф. дис.…канд. мед. наук. – Пермь, 2001. – 23 с.

Таблица.

Характеристики вторичного гуморального иммунного ответа, выраженность реакции ГЗТ и клеточность лимфоидных органов в условиях ежедневного введения T_4

N гр	Эксперимент. воздействие	IgM-АОК на орган	IgG-АОК на орган	Реакция ГЗТ (мм)	Число ЯСК селезенки, 10^6	Число ЯСК перитонеальной полости, 10^6	Число ЯСК крови, 10^6
1	Контроль n=11	4666,67 ± 1117,8	104484 ± 4454,1	0,56 ± 0,04	381,82 ± 24,15	12,18 ± 1,03	7,95 ± 0,91
2	Тироксин 0,04 мг/кг/сут. n=9	2777,78 ± 341,3	130777 ± 4326,9 * #	0,64 ± 0,02	404,17 ± 22,88	16,22 ± 1,02 * #	9,78 ± 0,62
3	Тироксин 40 мг/кг/сут. n=9	3944,44 ± 377,8 ×	122888 ± 3661,6 * #	0,68 ± 0,04	363,33 ± 30,55	12,44 ± 1,14 # ×	8,72 ± 0,60

Примечание. Результаты представлены в виде M ± m; n – число экспериментальных животных в группе, * - достоверность различий ($p < 0,05$) от контрольной группы по U-критерию Манна-Уитни, × - достоверность различий между экспериментальными группами, # - значимый эффект гормона ($p < 0,05$) по H-критерию Крускала-Уоллиса.

Bochkova M.S., Bachmetyev B.A., Shirshev S.V.

THYROXIN EFFECT ON SECONDARY HUMORAL IMMUNE RESPONSE, DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY REACTION AND LEUKOCYTE PHAGOCYTIC ACTIVITY

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, krasnykh-m@mail.ru, bachmetyev@iegm.ru, Shirshev@iegm.ru

Summary. Exogenous thyroxin (T_4) administration to sensitized animals is accompanied by multidirectional alterations in the formation of secondary humoral immune response and delayed-type hypersensitivity reaction (DTH). Therefore, the applied hormone while promoting IgG-antibody producers in a dose-dependent manner and non-affecting the DTH reaction created conditions for immune response polarization towards Th2-type. It was found that against a background of marked stimulation of secondary humoral response T_4 increased the number of nucleated cells (NCs) in a peritoneal cavity at the expense of macrophages with concurrent decrease in a number of monocytes capable of phagocytosis in a circulation.

Key words: thyroxin; secondary humoral immune response; delayed-type hypersensitivity; phagocytic activity.

УДК 612.017.1

Бродовский М.Б.[1], Лебединская О.В.[2], Лебединская Е.А.[2], Ахматова Н.К., Годовалов А.П.[2]

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ НА ФОНЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

[1]Государственное учреждение здравоохранения Свердловская областная клиническая больница №1, г. Екатеринбург, Россия, m74@mail.ru; [2]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития, г. Пермь, Россия, lebedinska@mail.ru

Резюме. Исследовано влияние нуклеината натрия на иммунофенотипические характеристики, цитотоксическую и пролиферативную активность мононуклеарных лейкоцитов селезёнки мышей на фоне индуцированной циклофосфаном иммуносупрессии. Установлено, что нуклеинат натрия коррегирует функциональные свойства спленоцитов и клеточный состав селезёнки, изменённые под действием цитостатика.

Ключевые слова: иммуносупрессия, циклофосфан, нуклеинат натрия, иммунофенотип, цитотоксическая и пролиферативная активность, мононуклеарные лейкоциты.

Введение

Актуальным направлением в разработке биотерапевтических методов лечения инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний является применение препаратов, повышающих активность эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета [1]. Ранее было показано, что нуклеинат натрия не оказывает отрицательного воздействия на организм экспериментальных животных, обладает активными иммуномодулирующими свойствами, что подтверждается морфологической картиной лимфоидных органов мышей [2]. В работе изучено влияние нуклеината натрия (НН) – натриевой соли низкомолекулярной РНК, выделенной из пекарских дрожжей, на иммунофенотипические особенности, цитотоксическую (ЦА) и пролиферативную (ПА) активность мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезёнки мышей на фоне иммуносупрессии (ИС), индуцированной введением циклофосфана (ЦФ).

Материалы и методы исследования

Было использовано 80 мышей линии Balb/c весом 22-26 граммов. 1-й группе мышей внутрибрюшинно вводили НН, 2-й – ЦФ в монорежимах, мыши 3-й группы получали НН в дозе 3 мкг после 4-хкратного введения ЦФ в дозе 100 мг. Контроль – 10 интактных животных. Иммунофенотип клеток селезёнки определяли на проточном цитометре FacsCalibur (Becton Dickinson, США) при помощи соответствующих моноклональных антител (Caltag Laboratories, США). Цитотоксическую активность мононуклеаров выявляли на линии клеток эритробластного лейкоза К-562 в МТТ-тесте. Определение пролиферативной активности МЛ (спонтанной и индуцированной конковалином) проводили в колориметрическом тесте с использованием витального красителя AlamarBlue (Biosource, Бельгия) и с оценкой результатов на флюориметре Versa Fluor V13 (Vtocal).

Результаты и обсуждение

Четырёхкратное введение циклофосфана вызывало у мышей иммуносупрессивное состояние. Через 24 часа после введения НН мышам с иммуносупрессией статистически значимо увеличивалось число клеток с поверхностными маркёрами CD3, CD3/NK, MHCII, CD8/MHC I, CD40, CD5/CD40 по сравнению с животными, получавшими только ЦФ. На 5-е сутки количество МЛ с фенотипом CD3, CD4, CD25, MHC I, CD19 приходило к нормальным значениям. Восстановление цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов начиналось через 96 ч после введения НН на фоне иммуносупрессии. Значения ЦА достигали контрольных цифр через 120 ч после введения иммуномодулятора.

Таблица 1.

Коррекция цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов селезёнок мышей под действием нуклеината натрия при индуцированной циклофосфаном иммуносупрессии

Группы	Препараты	Цитотоксическая активность, %		
		4ч	96 ч	120 ч
1	NN	26,00±1,15	53,30±3,18*	77,00±2,64*
2	Циклофосфан	0	8,70±1,50*	8,70±1,76*
3	ЦФ+NN	0	10,30±1,40*	25,30±1,50
4	Контроль	21,00±1,73	25,00±1,52	27,00±2,90

Примечание. * – $p<0,01$ – по отношению к контролю по критерию Вилкоксона и *t*-критерию Стьюдента.

Пролиферативная способность мононуклеарных лейкоцитов, сниженная под действием циклофосфана, восстанавливалась толь-

Таблица 2.

Коррекция пролиферативной активности мононуклеарных лейкоцитов селезенок мышей под действием нуклеината натрия при индуцированной циклофосфаном иммуносупрессии

Экспериментальное воздействие	Пролиферативная активность,%								
	4 ч			24 ч			120 ч		
	Спонтанная	Кон.А	ИС	Спонтанная	Кон.А	ИС	Спонтанная	Кон.А	ИС
ЦФ+NN	0	0	0	5,7±1,2	9,3±1,2*	1,6	10±0,58	29±1,86	2,9
ЦФ	0	0	0	4±0,57*	8,3±0,33*	2,1	9±1,2	20±2,9*	2,2
NN	21±2,6*	63±2,9*	3	60±4,04*	78,3±3,3*	1,3	34±4,1*	58,3±7,1*	1,7
Контроль	8,3±1,22	31±1,22	3,7	8,3±1,22	31±1,22	3,7	8,3±1,22	31±1,22	3,7

Примечание. ИС – индекс стимуляции – отношение пролиферативной активности МЛ стимулированной (Кон А) пробы к пролиферации МЛ в пробах без митогена. * – $p<0,05$ – по отношению к контролю по критерию Вилкоксона и *t*-критерию Стьюдента.

ко к 120 ч после введения нуклеината натрия. Причём это происходило одновременно в отношении и спонтанной, и стимулированной пролиферации МЛ (табл. 2).

Заключение

Таким образом, в исследуемых дозах нуклеинат натрия корригирует функциональные свойства МЛ и клеточный состав селезёнки, изменённые под влиянием индуцированной цитостатиком иммуносупрессии.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037р_урал_а и Администрацией Пермского края

ЛИТЕРАТУРА

1. *Horna P., Sotomayor E.M.* Cellular and molecular mechanisms of tumor-induced T-cell tolerance // Curr. Cancer. Drug. Targets. – 2007. – V. 7. – P. 41–53.

2. *Бродовский М.Б., Лебединская Е.А., Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Годовалов А.П., Пудилова Э.В.* Аспекты действия нуклеината натрия на лимфоидные и паренхиматозные органы мышей и мононуклеарные лейкоциты периферической крови здоровых доноров // Материалы международной научно-практической конференции “Современные проблемы инфекционной патологии человека”, Минск. – 2011. – Вып. 3. – С. 599–601.

3. *Лебединская Е.А., Некрасов А.М., Ахматова Н.К., Лебединская О.В.* Влияние нуклеината натрия на функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10. № 2. – С. 300–304.

Brodovsky M.B.[1], Lebedinskaya O.V.[2], Lebedinskaya E.A.[2], Melekhin S.V.[2], Godovalov A.P.[2]

IMMUNOPHENOTYPIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF MURINE MONONUCLEAR LEUKOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF NATRII NUCLEINAS ON INDUCED IMMUNOSUPRESSION

[1]Regional Hospital №1, Ekaterinburg, Russia, m74@mail.ru

[2]Acad. E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, lebedinska@mail.ru

Summary. The influence of natrii nukleinas on immunophenotypic properties, cytotoxic and proliferative activity of mononuclear leukocytes in the spleen of mice under cyclophosphamide-induced immunosuppression. It was found that natrii nukleinas corrected the functional properties of splenocytes and spleen cell composition, changed under the influence of cytostatic.

Key words: immunosuppression, cyclophosphamide, natrii nukleinas, immunophenotype, cytotoxic and proliferative activity, mononuclear leukocytes.

УДК 547.597+578.824.21+579.61:57.083.3

Галайко Н.В.[1], Баева Т.А.[2], Кетова Ю.А.[3], Волкова Л.В.[3], Гейн С.В.[2], Гришко В.В.[1]

ПРОТИВОВИРУСНАЯ И ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ А-СЕКОТРИТЕРПЕНОВОГО АЦЕТИЛГИДРАЗОНА

[1]Учреждение Российской академии наук Институт технической химии Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, grishko@aport.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, gein@iegm.ru; [3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский национальный исследовательский политехнический университет”, г. Пермь, Россия, wolkowalw@mail.ru

Резюме. Установлено, что А-секотритерпеновый ацетилгидразон относится к малотоксичным соединениям, проявляет высокую ($ЭД_{100}$ 0,0014 мкг/мл) вирулицидную активность *in vitro* в отношении вируса везикулярного стоматита штамм “Индиана” и оказывает *in vivo* дозозависимый (1,0–100,0 мг/кг) стимулирующий эффект на гуморальный иммунный ответ.

Ключевые слова: А-секотритерпеноиды, вирус везикулярного стоматита, вирулицидная активность, иммунотропная активность.

Введение

Растительный тритерпеноид бетулин, отличающийся высокой доступностью и разнообразной фармакологической активностью, широко используется в качестве перспективной базы для получения новых биологически активных соединений [1]. Достижения медицинской химии свидетельствуют о том, что полусинтетические производные бетулина (А-секопроизводные, в частности) обладают более высоким фармакологическим, а в ряде случаев – мультимедикаментозным действием.

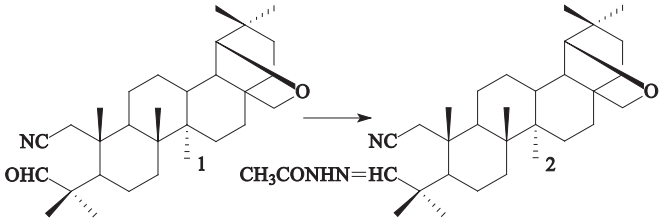
Недавно [2, 3] описан синтез на основе бетулина А-секотритерпеновых гидразонов 18αН-олеананового и лупанового типов, активно ингибирующих репродукцию вируса везикулярного стоматита штамм “Индиана” (ВВС). Следует отметить, что в настоящее время на фармацевтическом рынке нет ни вакцины, ни противовирусного лекарственного препарата для профилактики и лечения ВВС, активному распространению которого способствуют воздушно-капельный и трансмиссивный характер передачи инфекции, глобализация и мобильность населения, низкий уровень санитарно-гигиенической обстановки и медицины в странах Африки и Юго-Восточной Азии. В связи с этим противовирусные свойства синтезированных гидразонов были изучены [3] с использованием двух моделей, демонстрирующих (1) защиту клеточной системы от поражения вирусом и (2) подавление процесса репродукции вируса в первично инфицированных клетках, и отобран ацетилгидразон **2** (рис. 1), сочетающий профилактическую ($ЭД_{50}$ 0,00016 мкг/мл) и лечебную ($ЭД_{50}$ 0,21 мкг/мл) анти-ВВС активность. Цель настоящей работы – исследование вирулицидного действия ацетилгидразона **2** в отношении ВВС *in vitro* и иммунотропной активности данного соединения *in vivo*.

Материалы и методы исследования

Соединение **2** получали согласно методике [2]. В работе использовали ВВС из Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва, Россия) и перевиваемую клеточную линию почки эмбриона свиньи (СПЭВ) из Специализированной коллекции СХЖ НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАСХН (г. Москва, Россия). В тесте контактной ингибиции суспензии ВВС (100 $ТЦД_{50}$/0,1мл) инкубировали в питательной среде 199 в присутствии различных концентраций препарата **2** в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37±1 ^{0}С, через 1 ч суспензии вируса титровали в культуре клеток СПЭВ в аналогичных условиях. Эффект оценивали через 24 ч по показателям $ЭД_{100}$ и $ЭД_{50}$.

Влияние препарата на показатели гуморального иммунного ответа оценивали на беспородных белых мышах-самцах массой 17-22 г, которым вводили внутрибрюшинно 200 мкл 2% крахмальной слизи, содержащей препарат в дозах 100,0; 10,0 или 1,0 мг/кг. Через 1 ч животных иммунизировали эритроцитами барана в разовой дозе 10^8 кл/0,2 мл 0,9% NaCl. На 5 сут определяли количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Jerne. Статистический анализ проводили с использованием непарного однофакторного дисперсионного анализа и LSD-критерия Фишера (post-hoc). Результаты представлены в виде средней ± стандартная ошибка.

Острую токсичность определяли однократным введением препарата в 2% крахмальной слизи внутрибрюшинно в дозах 1,0; 0,5 и 0,1 г/кг, каждую дозу испытывали на 6 животных, в качестве контроля вводили эквиобъемное количество 2% крахмальной слизи. В течение последующих 14 сут учитывали смертность, изменение внешнего вида, веса и поведенческие реакции животных.



Реагенты и условия реакции: $CH_3CONHNH_2$, C_2H_5OH/CH_3COOH

Рис. 1. Схема синтеза ацетилгидразона 1-циано-19β,28-эпокси-2,3-секо-18α-олеан-3-аля (**2**).

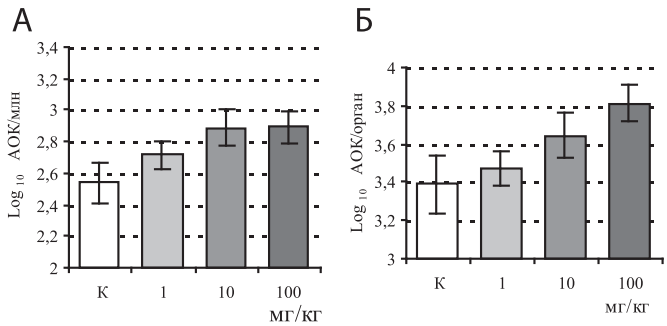


Рис. 2. Влияние соединения **2** на относительное (А) и абсолютное (Б) число АОК в регионарном лимфатическом узле при локальной иммунизации мышей (n=7-8).

Результаты и обсуждение

Одно из направлений в процессе разработки профилактических противовирусных средств касается поиска природных или синтетических аналогов клеточных рецепторов, с которыми на этапе прикрепления вириона к клетке-хозяина связываются вирусные белки. Учитывая высокий профилактический анти-ВВС эффект ацетилгидразона **2**, была проведена оценка вирулицидных свойств данного препарата *in vitro*. Полученные в тесте контактной ВВС-ингибиции данные свидетельствовали о высоком уровне нейтрализации препаратом инфекционной активности вируса. При этом показатель вирулицидной активности $ЭД_{50}$ 0,00059 мкг/мл соотносился с данными о профилактической активности препарата [3]. Динамика изменения вирулицидной активности препарата в зависимости от его концентрации и показатель $ЭД_{100}$ 0,0014 указывала на прямой дозозависимый вирулицидный эффект соединения **2**. Это давало возможность предположить, что механизм анти-ВВС действия препарата связан с разрушением (повреждением) вирусных частиц.

При исследовании безопасности препарата *in vivo* на модели животных изучали острую токсичность препарата и его действие на показатели гуморального иммунного ответа. По данным испытания иммунотропной активности, соединение **2** оказывает дозозависимый стимулирующий эффект на гуморальный иммунный ответ, усиливая процессы антителообразования в абсолютном и относительном выражении (рис. 2). Установлено, что препарат не вызывает гибели, возбуждения или угнетения активности животных и относится к малотоксичным соединениям (4 класс токсичности, по классификации К.К. Сидорова).

Выводы

Полученные данные подтверждают терапевтическую перспективность малотоксичного ацетилгидразона **2** в качестве агента, сочетающего специфическое анти-ВВС действие и иммуномодулирующую активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-03-00642а и интеграционного проекта (№ 09-С-3-1021) фундаментальных исследований, выполняемых в УрО РАН совместно с учеными СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г.* Терпеноиды ряда лупана как перспективные для медицины биологически активные агенты Часть 2. Полусинтетические производные Лупана. Обзор // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – Т. 13. – С. 1–30.

2. *Толмачева И.А., Галайко Н.В., Гришко В.В.* Синтез ацилгидразонов на основе лупановых и 19β,28-эпокси-18α-олеананановых 2,3-секоальдегидонитрилов // Химия природ. соедин. – 2010. – № 1. – С. 37–40.

3. *Галайко Н.В., Толмачева И.А., Гришко В.В., Волкова Л.В., Перевозчикова Е.Н., Пестерева С.А.* Противовирусная активность лупановых и 19β,28-эпокси-18α-олеананановых 2,3-секотритерпеновых гидразонов // Биоорган. химия. – 2010. – Т. 36. № 4. – С. 556–562.

Galayko N.V.[1], Bayeva T.A.[2], Ketova J.A.[3], Volkova L.V.[2], Gein S.V.[3], Grishko V.V.[1]

ANTIVIRAL AND IMMUNOTROPIC ACTIVITIES OF A-SECOTRITERPENE ACYLHYDRAZONE

[2]Institute of Technical Chemistry, UB RAS, Perm, Russia, grishko@aport.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, gein@iegm.ru; [3]State National Research Polytechnic University of Perm, Perm, Russia, wolkowalw@mail.ru

Summary. It has been found that A-secotriterpene acetylhydrazone belongs to low-toxic compounds, exhibits high (EC_{100} 0.0014 mg/ml) *in vitro* virucidal activity against vesicular stomatitis virus Indiana strain and has *in vivo* dose-dependent (1.0-100.0 mg/kg) stimulatory effect on humoral immune evocation.

Key words: A-secotriterpenoids, Indiana strain of the vesicular stomatitis virus, virucidal activity, immunotropic activity

---

УДК 577.27

Глебездина Н.С., Куклина Е.М., Ширшев С.В.

АНАЛИЗ РЕАКТИВНОСТИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ αβТ-ЛИМФОЦИТОВ БЕРЕМЕННЫХ САМОК НА АНТИГЕНЫ САМЦА

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, glebezdina_n@mail.ru.

Резюме. Изучена реактивность αβТ-лимфоцитов беременных самок СВА в отношении антигенов самца в периферических лимфоидных органах мышей при нормальной аллогенной, сингенной беременности и склонной к аборту комбинации. Показано, что при нормальной аллогенной беременности αβТ-лимфоциты дренирующих матку (парааортальных) лимфатических узлов отвечают на антигены самца достоверно эффективнее Т-клеток лимфоузлов, не дренирующих матку – мезентериальных и подмышечных. Возможно, данный эффект связан с локальным изменением антигенраспознающего репертуара этих клеток.

Ключевые слова: αβТ-лимфоциты, экстратимическая дифференцировка, антигенраспознающий репертуар, беременность.

Введение

Процесс экстратимической реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (T Cell Receptor, TCR), выявленный нашими недавними исследованиями в периферических Т-лимфоцитах при беременности [1], теоретически должен сопровождаться появлением на мембране Т-лимфоцита нового антигенного рецептора с измененной специфичностью [2]. А поскольку на периферии отсутствуют условия, обеспечивающие эффективную клональную селекцию вновь образующихся Т-клеток (как это в норме происходит в тимусе), реаранжировка генов TCR в периферических лимфоидных органах неизбежно должна сопровождаться изменением антигенраспознающего репертуара Т-лимфоцитов, в частности, появлением аутореактивных Т-клеточных

клонов. Целью настоящей работы было сопоставление антигенраспознающей активности αβТ-лимфоцитов беременных мышей с таковой для небеременных при разных вариантах скрещивания – нормальном аллогенном, сингенном и в склонной к аборту комбинации.

Материалы и методы исследования

Работа проведена на линейных самках мышей CBA, которых скрещивали с самцами разных линий – BALB/c (нормальная аллогенная беременность), CBA (нормальная сингенная беременность) и DBA/2 (склонная к аборту комбинация) [3, 4]. Беременность фиксировали по появлению вагинальной пробки. Срок беременности у животных (9-е сутки) подбирался в соответствии с тем, что у самок CBA x DBA/2 аборты происходят, как правило, на 10-14 день беременности [3, 4].

Исследовались фракционированные периферические Т-лимфоциты, выделенные из лимфоузлов трех разных типов – парааортальных (дренирующих матку), мезентериальных и подмышечных (не дренирующих матку) [4]. Антигенраспознающую активность Т-клеток при беременности оценивали по пролиферативному ответу фракционированных αβТ-лимфоцитов лимфатических узлов беременных мышей (2 x 10^5 на пробу) на антигены самцов соответствующих линий и небеременных самок, в однонаправленной смешанной культуре лимфоцитов. В качестве стимулирующих клеток использовали спленоциты мышей, а также, в ряде экспериментов, фракционированные αβТ-лимфоциты подмышечных и мезентериальных лимфатических узлов (2 x 10^5 на пробу), предварительно обработанных митомицином С (25 мкг/мл). Результаты оценивали в МТТ-тесте, основанном на определении количества жизнеспособных клеток в пробе [5]. Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Анализ пролиферативного ответа αβТ-лимфоцитов беременных самок CBA на антигены самцов соответствующих линий показал, что при нормальной беременности (и сингенной, и аллогенной) индекс пролифереции Т-клеток, определяемый как отношение показателей пролиферативной активности в стимулированной и нестимулированной пробах, выше, чем у небеременных животных, но зависит от типа лимфатических узлов, из которых они получены. Наиболее выраженным этот эффект был при нормальной аллогенной беременности (CBA × BALB/c) для Т-лимфоцитов парааортальных лимфоузлов, дренирующих матку (индекс стимуляции составил 2,09±0,222, $p<0,05$), существенно меньшим, но статистически значимым – для подмышечных (1,69±0,196, $p<0,05$), тогда как для Т-клеток мезентериальных лимфатических узлов (1,49±0,124) ответ на антигены самца не отличался от такового для небеременных самок CBA (1,39±0,089). Более того, достоверные различия в индексах пролиферации были выявлены и в пределах одной группы животных: ответ Т-клеток у беременных самок CBA × BALB/c был выше в парааортальных лимфатических узлах (2,09±0,222, $p<0,05$) по сравнению с мезентериальными (1,49±0,124). В отличие от нормальной беременности, в комбинации CBA x DBA/2, характеризующейся высоким уровнем спонтанных абортов, ответа периферических Т-клеток на антигены самцов DBA/2 не выявлено (1,01±0,035, $p<0,05$). Возможно, отсутствие ответа в данной модели и является одной из причин предрасположенности к абортам, поскольку, согласно современным представлениям, для успешной имплантации и плацентации необходим достаточный уровень иммунореактивности материнского организма в отношении отцовских и фетальных антигенов – цитокины, секретируемые в ходе иммунного ответа, оказывают трофическое действие на плаценту и плод [6].

Возможно, выявленный нами эффект связан с локальным изменением антигенраспознающего репертуара этих клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ширшев С.В., Куклина Е.М., Максимов А.Ю., Крапивина О.А., Паршакова Н.С.* Экстратимическая реаранжировка генов антигенного рецептора αβТ-лимфоцитов при беременности // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – № 9. – С. 1207–1213.
2. *Куклина Е.М.* Ревизия антигенного рецептора Т-лимфоцитов // Биохимия. – 2006. – Т. 71. № 8. – С. 1021–1033.
3. *Chaouat G., Kiger N., Wegmann T.G.* Vaccination against spontaneous abortion in mice // J. Reprod. Immunol. –1983. – V. 5. N. 6. – P. 389–392.
4. *Lin Y., Zeng Y., Zhao J., Zeng S., Huang J., Feng Z., Di J., Zhan M.* Murine CD45+CD86+ cells isolated from para-aortic lymph nodes in an abortion-prone model // J. Reprod. Immunol. – 2004. – V. 64. – P. 133–143.
5. *Wei X., Jing L., Meiyu G., Xin X., Ding J.* Potentiation of T Cell Function by a Marine Algae-Derived Sulfated Polymannuroguluronate: *In Vitro* Analysis of Novel Mechanisms // J. Pharmacol. Sci. – 2005. – V. 97. N. 1. – P. 107–115.
6. *Wegmann T.G., Hui L., Guilbert L., Mosmann T.R.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? // Immunol. Today. – 1993. – V. 14. N. 7. – P. 353–356.

Glebezdina N.S., Kuklina E.M., Shirshev S.V.

THE ANALYSIS OF REACTANCE PERIPHERAL αβT-LYMPHOCYTES PREGNANT FEMALES ON ANTIGENES OF THE MALE

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, glebezdina_n@mail.ru

Summary. It is studied the reactivity of αβT-lymphocytes of pregnant females with respect to male antigens in peripheral lymphoid organs of mice CBA with normal allogeneic, syngeneic pregnancy and abortion-prone combination. It is shown, that in normal allogeneic pregnancy αβT-lymphocytes of draining the uterus (para-aortic) lymph nodes respond to male antigens significantly more effective than T-cells in not draining the uterus lymph nodes (mesenteric and axillary). Probably, this effect is connected with local change of antigen recognizing repertoire of these cells.

Key words: αβT- lymphocytes, extratymic differentiation, antigen recognizing repertoire, pregnancy.

УДК 612.017.1–612.018+577.175.44

Годовалов А.П.[1], Шилов Ю.И.[1,2]

ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ЛИМФОЦИТОВ В КУЛЬТУРАХ С КОНКАНАВАЛИНОМ А *IN VITRO*

[1]ГБОУ ВПО “Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера” Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Пермь, Россия, agodovalov@gmail.com; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, jshilov@mail.ru

Резюме. Направленность действия тироксина *in vitro* на пролиферативный ответ лимфоцитов практически здоровых людей в культурах с конканавалином А (Кон А) зависит от концентрации митогена. Тироксин активирует пролиферацию лимфоцитов в культурах с 20 мкг/мл Кон А и угнетает ее в культурах с концентрацией Кон А 2,5 мкг/мл.

Ключевые слова: тироксин, пролиферация лимфоцитов человека, конканавалин А.

Введение

Выраженные изменения функций различных звеньев иммунной системы выявлены как при гипотиреозе (включая генетические дефекты тиреоидных рецепторов) [4], так и при экспериментальном тиреотоксикозе [1–3]. В связи с тем, что в условиях целостного организма иммуномодулирующие эффекты снижения или повышения уровня тиреоидных гормонов могут быть связаны с целым рядом непрямых механизмов, для оценки прямого гормонального действия важное значение могут иметь исследования в системе *in vitro*. Цель настоящей работы – исследование влияния тироксина на пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови практически здоровых людей в культурах с конканавалином А *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин (d=1,077 г/см^3) из периферической крови 8 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от

Таблица.

Влияние тироксина на пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови практически здоровых людей в культурах с Кон А *in vitro*

Концентрация тироксина, М	Без митогена	Концентрация Кон А, мкг/мл				
		2,5	5,0	10,0	20,0	40,0
10^{-8}	3,3569±0,1469 (2275)	3,6450±0,0666 (4416)	3,4992±0,1758 (3157)	4,0376±0,1045 (10904)	4,2098±0,0581 (16210)*	4,0105±0,2816 (10244)
10^{-9}	3,3440±0,1028 (2208)	3,4225±0,1065 (2646)*	3,7696±0,1218 (5883)	3,9375±0,0687 (8659)	4,2234±0,0453 (16728)*	3,9160±0,2468 (8242)
10^{-10}	3,2289±0,1430 (1694)	3,5978±0,0843 (3961)	3,7382±0,0832 (5472)	3,7635±0,0566 (5801)	4,0851±0,0804 (12166)	4,2206±0,1025 (16618)
0 (контроль)	3,3770±0,1331 (2383)	3,7472±0,0745 (5587)	3,7605±0,1007 (5761)	3,7605±0,1097 (8601)	4,0318±0,0909 (10759)	4,1744±0,1136 (14941)

Примечание. Приведены значения M±m для показателей $\log_{10}$ имп/мин, а в скобках – средние геометрические имп/мин (антилогарифм из M log10 имп/мин); * - $p<0,05$ по отношению к контролю по апостериорному критерию Дункана для парных данных.

19 до 27 лет. Пролиферацию лимфоцитов оценивали в культурах с Т-клеточным митогеном конканавалином А (Кон А, Boehringer Mannheim GmbH, Германия, кат. номер 1296779) в концентрациях 2,5, 10, 20 и 40 мкг/мл и без него. Каждая культура содержала $2x10^5$ мононуклярных клеток в 0,2 мл среды 199 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES, 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% аутоплазмы на лунку круглодонного 96-луночного планшета. Метил-^{3}Н-тимидин (Радиевый институт имени В.Г. Хлопина, Санкт-Петербург) вносили по 1 мкКи через 48 ч от начала культивирования во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37^{0}С. Через 24 ч культивирования клетки осаждали на мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Уровень радиоактивности в кислотонерастворимой фракции оценивали на жидкостном сцинтилляционном счетчике “Guardian” WinSpectral DSA 1414-03 (“Wallac”, Финляндия). Для оценки влияния тироксина на пролиферативный ответ лимфоцитов в опытные культуры в момент их постановки вносили водорастворимую форму гормона (пентогидрат натриевой соли L-тироксина для клеточных культур, “Sigma”, США–Германия, кат. номер T0397) в диапазоне концентраций от 10^{-8} до 10^{-10} М, контролем служили культуры без гормона. Статистический анализ результатов проводили с учетом log-нормального распределения показателей пролиферации с использованием парного варианта апостериорного критерия Дункана для множественного сравнения между группами.

Результаты и обсуждение

Установлено, что тироксин в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М стимулирует пролиферацию лимфоцитов в культурах с добавлением 20 мкг/мл Кон А (таблица).

В сравнении с культурами без гормона оптимум концентрации митогена сдвигается с 40 на 20 мкг/мл. В культурах с субоптимальной концентрацией Кон А (2,5 мкг/мл) тироксин в концентрации 10^{-9} М снижает пролиферативный ответ. При концентрации тироксина 10^{-10} М статистически значимые изменения пролиферативного ответа лимфоцитов отсутствуют, максимальная пролиферация, как и в контроле, регистрируется в культурах с добавлением 40 мкг/мл Кон А. Выявленная зависимость направленности изменения тироксином пролиферации лимфоцитов от концентрации митогена, возможно, связана с изменениями на внутриклеточном уровне экспрессии ядерных гормонсвязывающих рецепторов и регуляторных сигналов с них при различном уровне активации клеток, т.к. подобные эффекты описаны для стероидных гормонов и катехоламинов [5]. Нельзя исключить и возможность ее реализации на уровне межклеточных взаимодействий, что требует дальнейших исследований.

Выводы

Направленность действия тироксина *in vitro* на пролиферативный ответ лимфоцитов практически здоровых людей в культурах с Кон А зависит от концентрации митогена.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бахметьев Б.А.* Влияние тироксина на отдельные этапы иммуногенеза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1986. – 20 с.
2. *Кеворков Н.Н.* Гормональная регуляция иммунного ответа: Дис. в виде науч. докл. ... д-ра мед. наук. – Пермь, 1995. – 52 с.
3. *Кеворков Н.Н.*, *Бахметьев Б.А.* Некоторые механизмы влияния экзогенного тироксина на регуляцию иммунного ответа у мышей // Пробл. эндокринол. –1984. – Т. 30(4). – С. 52–56.
4. *Arpin C.*, *Pihlgren M.*, *Fraichard A.*, *Aubert D.*, *Samarut J.*, *Chassande O.*, *Marvel J.* Effects of T3Rα1 and T3Rα2 gene deletion on T and B lymphocyte development // J. Immunol. – 2000. – V. 164(1). – P. 152–160.
5. *Cosentino M.*, *Marino F.*, *Bombelli R.*, *Ferrari M.*, *Lecchini S.*, *Frigo G.* Unravelling dopamine (and catecholamine) physiopharmacology in lymphocytes: open questions//Trends Immunol. – 2003. – V. 24(11). – P. 581–583.

Godovalov A.P.[1], Shilov Ju.I.[1,2]

EFFECT OF THYROXINE ON THE PROLIFERATIVE RESPONSE OF LYMPHOCYTES IN CULTURES WITH CONCANAVALIN A *IN VITRO*

[1] Acad. E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, agodovalov@gmail.com; [2] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia, jshilov@mail.ru.

Summary. The directivity of the action of thyroxine *in vitro* on the proliferative response of lymphocytes of healthy people in cultures with concanavalin A (Con A) depends on the concentration of mitogen. Thyroxine activates lymphocyte proliferation in cultures with 20 μg/ml of Con A and inhibits its in the cultures with concentration of Con A of 2.5 μg/ml.

Key words: thyroxine, proliferation of human lymphocytes, concanavalin A.

УДК 616-097

Гугович А.М., Харахорина Р.А., Долгих О.В.

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

Федеральное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения”, г. Пермь, Россия, gugovich@yandex.ru, Itkinina-Regina@yandex.ru, oleg@fcrisk.ru

Резюме. Данная статья посвящена оценке особенностей активационных клеточных маркеров и аннексин-индуцированного апоптоза в условиях воздействия химических факторов. Установлена зависимость между активационными и сигнальными маркерами апоптоза и показателями, отражающими контаминацию биосред (содержание хлороформа, ванадия и марганца в крови) у детей, проживающих на экологически неблагоприятных территориях Пермского края с различной техногенной химической нагрузкой. Выявлено, что органические соединения и тяжелые металлы имеют разнонаправленный характер действия на процесс вступления клеток в стадию апоптоза.

Ключевые слова: лимфоцит, апоптоз, хлороформ, тяжелые металлы.

Введение

Иммунная система является одной из важнейших гомеостатических систем организма и во многом определяет степень здоровья человека и его адаптационные возможности. Неблагоприятные экологические условия, наличие в атмосфере ксенобиотиков вызывают различные нарушения в работе иммунной системы ребенка, приводя к возникновению заболеваний, связанных с нарушением иммунорегуляторных процессов, причем число таких детей с каждым годом растет [1]. Здоровье детей, организм которых наиболее чувствителен к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, может служить в некоторой мере индикатором качества среды обитания [2].

Целью настоящего исследования явился анализ особенности иммунного статуса у детей, проживающих на территориях с различной техногенной контаминантной нагрузкой.

Материалы и методы исследования

Всего в обследовании приняли участие 536 детей, проживающих на территории Пермского края. Основную группу составил 401 ребенок из промышленно развитых территорий с различной техногенной химической нагрузкой. В группу контроля были включены 135 детей, проживающих вне зон антропогенного воздействия. Основная и контрольная группы были сопоставимы по возрасту и соматической заболеваемости.

Исследование биосред (кровь) на содержание органических соединений (хлороформ) выполнялось на капиллярном газовом хроматографе "Кристалл 2000" (ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия). Содержание металлов (марганец, ванадий) в крови определялось методом прямого определения на атомно-абсорбционном спектрофотометре "Perkin Elmer 3110" ("Perkin Elmer", США). Определение поверхностных маркеров активации клеток (CD25 и CD95) проводили методом иммунофлюоресценции с применением набора соответствующих моноклональных антител ("Becton Dickinson", США). Апоптоз лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии с помощью специфических флюорохромов – аннексина V, конъюгированного с флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) и пропидиум йодида (Propidium Iodide) ("BD", США). Анализ флюоресценции проводили на проточном цитометре FACSCalibur ("BD", США), обработка данных велась в универсальной программе CellQuestPro. При регистрации результатов в каждой пробе просчитывали не менее 10 000 событий, попавших в выделенный регион.

Для статистической обработки результатов исследования применялись методы математической статистики с помощью программ Microsoft® Office Excel 2003 и Statistica 6.0. За порог достоверности различий принимали значение $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Первый этап исследования включал обследование детей, проживающих на территории, отличающейся низким качеством питьевой воды по санитарно-химическим показателям (n=283). Анализ уровня контаминации биосред данной группы позволил установить, что в организме регистрируется значимое повышение концентрации хлороформа (0,0113±0,0024 мкг/см^3) по сравнению с контрольной группой (отсутствие контаминации).

Выявлено, что у всех обследуемых основной группы наблюдалось статистически значимое повышение активационного маркера CD25$^+$, как в относительных (6,49±0,46 % при $p<0,05$), так и в абсолютных (0,17±0,01 10^9/л при $p<0,05$) величинах по сравнению с контрольными значениями (5,42±0,12 % и 0,14±0,004 10^9/л соответственно).

Было установлено статистически значимое снижение количества клеток, вступивших как в стадию апоптоза – Annexin V-FITC$^+$PI$^-$-клетки (1,62±0,10 % при $p<0,05$), так и в стадию некроза – Annexin V-FITC$^+$PI$^+$-клетки (7,02±0,59 % при $p<0,05$) по сравнению с группой контроля (1,96±0,09 % и 9,88±0,42 % соответственно).

На втором этапе было проведено обследование 118 детей, проживающих в зоне влияния выбросов металлургического комбината. При оценке уровня контаминации крови обследуемых было установлено достоверное ($p<0,05$) повышение концентрации ванадия (0,0038±0,0011 мг/дм^3) и марганца (0,0286±0,0023 мг/дм^3) у исследуемых детей по сравнению с группой контроля (0,0016±0,0001 и 0,0171±0,0013 мг/дм^3 соответственно).

У детей, проживающих на промышленно развитой территории, отмечено статистически значимое повышение относительного и абсолютного содержания CD25$^+$-лимфоцитов (7,62±0,94% и 0,21±0,04 10^9/л соответственно) в сравнении с группой контроля (5,04±0,29% и 0,13±0,01 10^9/л соответственно) при $p<0,05$. Также было зафиксировано повышение клеточного маркера CD95$^+$, но не достигшее статистически значимого уровня (25,55±1,04 % в сравнении с контролем 27,97±1,23%).

У всех обследуемых основной группы было установлено достоверное ($p<0,05$) повышение количества клеток, вступивших как в стадию апоптоза (2,41±0,13%), так и в стадию некроза (9,72±0,49%) по сравнению с контрольными значениями (1,22±0,08% и 7,89±0,57% соответственно).

Полученные данные позволяют сделать заключение, что трансформация иммунных реакций тесно связана с особенностями химической нагрузки. Избыточная стимуляция организма техногенными гаптенами различной природы сопровождается стимулированием функциональной активности лимфоцитов. При этом органические соединения и тяжелые металлы имеют разнонаправленный характер действия на процесс вступления клеток в стадию апоптоза, как активируя, так и подавляя данную реакцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. и др.* Оценка иммунологического статуса в условиях воздействия химических факторов // Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический сборник по аллергологии и иммунологии. – 2010. – Т. 29. № 2/1. – С.124–125.

2. *Сухарев А.Г., Михайлова С.А.* Состояние здоровья детского населения в напряженных экологических и социальных условиях // Гигиена и санитария. – 2004. – № 1. – С. 47–51.

Gugovich A.M., Kharakhorina R.A., Dolgikh O.V.

CELLULAR DEATH MECHANISMS UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS CHEMICAL LOADS

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia, gugovich@yandex.ru, Itkinina-Regina@yandex.ru, oleg@fcrisk.ru

Summary. This article is devoted to the estimation of features of activation cellular markers and annexin-induced apoptosis under the impact of chemical factors. The study identified the correlation between activation markers of apoptosis and indicators of biological media contamination (blood chloroform, vanadium and manganese levels) in children living in environmentally adverse territories of Perm Region under various technogenic chemical loads. It was established that the organic compounds and heavy metals have a multidirectional character of action on the introduction of cells into an apoptosis stage.

Key words: lymphocyte, apoptosis, chloroform, heavy metals.

УДК 615.281.9

Гужева Л.Б. [1], *Волков А.Г.* [2], *Артюшкин М.В.* [3], *Ерошенко Д.В.* [4], *Коробов В.П.* [4]

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ИНТЕРФЕРОНОГЕНЕЗА

[1]Филиал ФГУП НПО "Микроген" Минздравсоцразвития России в г. Пермь "Пермское НПО "Биомед", г. Пермь, Россия; [2]ГБОУ ВПО "Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера", г. Пермь, Россия; [3]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский национальный исследовательский политехнический университет", г. Пермь, Россия; [4]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, dasha.eroshenko@gmail.ru

Резюме. Изучены биологические свойства низкомолекулярного пептидного комплекса, побочного продукта интерфероногенеза. Показано антибактериальное действие изучаемого пептида в отношении *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* 33. Увеличение концентрации пептида оказывает цитотоксический эффект на клетки СПЭВ. Максимально переносимая концентрация пептидного комплекса для клеток СПЭВ на порядок выше МПК для бактерий и составляет 1,25 мкг/мл.

Ключевые слова: пептид, интерфероногенез, антибактериальные и цитотоксичные свойства.

Введение

Бактериальные инфекции занимают важное место в структуре патологии человека, и борьба с ними в последние годы становится все более актуальной. В наши дни единственным эффективным средством лечения инфекционных заболеваний являются антибиотики, использование которых неизменно сопровождается возникновением устойчивых к этим препаратам штаммов. Для исследований последнего времени характерно нарастание потока сведений относительно особых соединений пептидной природы, обладающих выраженной антимикробной активностью. Все исследованные пептиды характеризуются относительно небольшими размерами, термостабильностью, высокой изоэлектрической точкой и ингибирующей активностью в отношении широкого спектра бактерий. Анализ литературы свидетельствует о том, что низкомолекулярные пептиды лишены недостатков классических антибактериальных препаратов: для них пока не описаны анафилактоидные реакции, поскольку они малоантигенны, к ним практически не вырабатывается резистентности со стороны микробов. При этом многие пептиды обладают эндотоксиннейтрализующей и иммунорегулирующей активностью. Будучи факторами проницаемости, они усиливают действие традиционно используемых антибиотиков. В этой связи особый интерес представляет изучение антибактериальных свойств пептидов небольшой молекулярной массы, продуцируемых индуцированными лейкоцитами человека в среду культивирования в процессе интерфероногенеза. Накопление таких пептидов к окончанию производственного цикла достигает высокого уровня, что открывает возможности детального изучения их физико-химических и биологических свойств, а также разработки способа их промышленного получения для использования в различных практических целях, в частности, как естественных, нетоксичных для человека антибактериальных средств. Цель настоящего исследования – оценка биологических свойств низкомолекулярного полипептидного комплекса, синтезируемого в процессе интерферногенеза, полученного по унифицированной технологии.

Материалы и методы исследования

В работе использован низкомолекулярный пептидный комплекс, побочный продукт синтеза вирусиндуцированными лейкоцитами в процессе интерфероногенеза, который выделен с использованием каскада ультрафильтрацонных пластин с размерами пор от 300 кДа до 5 кДа с последующей лиофилизацией и растворением в инъекционной воде до концентрации по белку 40мг/мл, любезно предоставленный научным отделом ФГУП "НПО "Микроген" Филиал "Пермское НПО "Биомед".

Оценку антибактериальной активности полученного пептидного препарата проводили микрометодом серийных разведений [1]. Действие препарата оценивали по отсутствию роста микроорганизмов в лунках круглодонных планшетов, каждая из которых содержала 100 мкл среды (мясо-пептонный бульон), 100 мкл пептидного комплекса в соответствующем разведении и 10 мкл исследуемой культуры. Готовили серии двойных разведений пептидного комплекса против референтного штамма *Staphyiococcus epidermidis* № 33 (Коллекция ГИСК имени Л.А. Тарасевича, Москва).

Оценку цитотоксического действия пептида на неинфицированные клетки СПЭВ (клетки почек эмбриона свиньи) осуществляли путем введения различных количеств препарата в состав поддерживающей среды, которой покрывали сформировавшийся монослой. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2; посевная доза – 44 тыс. клеток/лунку (в объеме 200 мкл). Действие препарата оценивали ежедневно методом световой микроскопии по степени изменения морфологии клеточного монослоя. Определяли $ЦТД_{50}$ препарата, которая соответствовала концентрации, вызывающей видимые нарушения морфологии у 50% клеток монослоя и максимально переносимую концентрацию (МПК) – наиболее высокую дозу препарата, не вызывающую видимых изменений клеточного монослоя, по сравнению с контролем. Для дальнейшего исследования применяли концентрации препаратов, не превышающие МПК [2].

Обработку цифрового материала осуществляли с помощью компьютерных программ Statistica for Windows (StatSoft, Inc., 1995).

Результаты и обсуждение

Исходный уровень активности препарата пептидного комплекса, обладающего антибактериальной активностью, как было ранее показано, зависел от исходного сырья - донорской крови, условий синтеза и в среднем составлял 0,16±0,002 мг/мл при удельной антибактериальной активности 101-115 УЕ/мг белка.

В условиях унифицированного эксперимента с использованием равной концентрации микробной взвеси ($1{,}5x10^6$ КОЕ/мл) показана чувствительность к пептидному комплексу *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538-Р) и *Staphyiococcus epidermidis* 33.

Цитотоксическое действие полученного пептидного комплекса на перевиваемую линию клеток СПЭВ изучено в серии экспериментов в диапазоне концентраций от 0,02 до 40 мкг/мл. Установлено, что степень выраженности цитотоксического эффекта зависит от использованной концентрации препарата в среде инкубации. Так, при концентрации 40 мкг/мл препарат вызывает практически полную гибель клеток через 24 ч инкубирования, а в концентрации 5 мкг/мл вызывает изменение у 50% клеток монослоя ($ЦТД_{50}$). МПК пептида для клеток СПЭВ составила 1,25 мкг/мл, что на порядок превышает МПК для бактерий. По данным теста с трипановым синим, количество жизнеспособных клеток через 72 ч инкубирования в присутствии 0,02-1,25 мкг/мл препарата практически не отличалось от такового в контроле.

Выводы

Результаты проведенных исследований подтверждают продукцию индуцированными лейкоцитами человека комплекса низкомолекулярных пептидных соединений с молекулярными массами менее 5 кДа, обладающих выраженными антибактериальными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Korobov V.P.*, *Akimenko V.K.*, *Kuznetsov V.P.*, Gulevskaya S.A., Suzina T.E., Maleeva L.I. Antibacterial action of interferon preparations // FEMC Microbiol. Letters. – 1988. – V. 49. N.2. – P. 157–162.

2. Методы культивирования клеток / Под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008.– 289 с.

Guzheva L.B. [1], *Volkov A.G.* [2], *Artyushkin M.V.* [3], *Eroshenko D.V.* [4], *Korobov V.P.* [4]

THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE LOW-MOLECULAR PEPTIDE COMPLEX SYNTHESIZED BY THE HUMAN LEUKOCYTES DURING INTERFERONOGENESIS

1Perm SPA "Biomed", Perm Branch of FSUE SPA "Microgen" of the Public Health and Social Development Ministry of Russia, Perm, Russia; 2Perm State Medical Academy, Perm, Russia ; 3Perm National Research Technical University, Perm, Russia; 4Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

Summary. Biological properties of a low molecular weight peptide complex, a byproduct of interferonogenes were studied. The average level of activity was 0.155 ±0.002 mg/ml. The peptide showed the antibacterial action toward *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* 33. Increasing the concentration of the peptide has a greater cytotoxic effect on SPEV cells. The maximum tolerated concentration (MTC) of the peptide complex for SPEV cells was much higher that that for the bacteria and was 1.25 μg / ml.

Key words: peptide, interferonogenesis, antibacterial and cytotoxic properties.

УДК 618.3-008.6:616.1-07

Заварин В.В., Радьков О.В., Ильинская Т.А., Синявская О.И.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА -1082G/A ГЕНА *IL10* С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РЕАКТИВНОСТИ МИКРОСОСУДОВ КОЖИ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Тверская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Тверь, Россия, vvzavarin@mail.ru

Резюме. Изучены особенности микроциркуляции и формирования дисфункции эндотелия при преэклампсии (ПЭ) в зависимости от полиморфизма -1082G/A гена *IL10*. Для этого обследовано 280 беременных, из которых 168 больных ПЭ и 112 здоровых. Оценка скоростных показателей кровотока в микрососудах кожи (МК) выполнена с помощью ультразвуковой допплерографии. Полиморфизм -1082G/A гена *IL10* типирован методом ПЦР. Установлено, что среди больных ПЭ преобладает носительство аллеля -1082A гена *IL10*, а GG генотип этого полиморфного маркера чаще встречается у здоровых беременных. Нарушение функции эндотелия при ПЭ проявляется снижением прироста кровотока в МК и продолжительности реактивной гиперемии (t РГ). Выраженность дисфункции эндотелия при ПЭ зависит от локуса -1082G/A гена *IL10*, причем наиболее низкие значения t РГ и максимального кровотока установлены при генотипе AA. Таким образом, полиморфизм -1082G/A гена *IL10* влияет на особенности микроциркуляции и формирование дисфункции эндотелия при ПЭ.

Ключевые слова: преэклампсия, эндотелиальная дисфункция, полиморфизм генов.

Введение

Патофизиологические механизмы преэклампсии связаны с нарушением иммунного ответа. Интерлейкин-10 (IL-10) является противовоспалительным, поэтому уменьшение его концентрации и уровня экспрессии мРНК выявлено при преэклампсии (ПЭ). Установлена генетическая неоднородность IL-10, однако остается неясным, влияет ли этот полиморфизм на особенности микроциркуляции и проявление эндотелиальной дисфункции при ПЭ.

Цель исследования: изучить особенности микроциркуляции и формирования эндотелиальной дисфункции при ПЭ в зависимости от полиморфизма -1082G/A гена *IL10*.

Материалы и методы исследования

Обследовано 280 беременных, из которых 168 пациенток с ПЭ и 112 здоровых беременных (контрольная группа). Однонуклеотидный полиморфизм -1082G/A гена *IL10* (rs1800896) типировали с помощью ПЦР. Скоростные показатели кровотока в микрососудах кожи (МК) изучены с помощью ультразвуковой допплерографии. Для оценки реактивности МК проводили пробу с постокклюзионной реактивной гиперемией (ПРГ). После декомпрессии в течение 3 мин допплерограммы записаны через 30 сек, 1, 2, 3, 4 и 5 мин. Количественно ПРГ отражает коэффициент прироста кровотока в коже ($V_{\%увел}$), рассчитанный по формуле: $V_{\%увел} = V_{max} - V_{исх} / V_{исх} \cdot 100\%$, где $V_{исх}$ – фоновый, V_{max} – максимальный кровоток, и продолжительность реактивной гиперемии (t РГ).

Результаты и обсуждение

Полиморфизм -1082G/A гена *IL10* ассоциирован с ПЭ (табл. 1). Так, носительство гетерозиготного AG генотипа увеличивает вероятность ПЭ в 2,72 раза, а гомозиготный генотип AA в 3,34 раза. Один аллель A повышает риск развития заболевания в 2,05 раза, а аллель G и генотип GG полиморфизма -1082G/A гена *IL10* обладают защитным эффектом с точки зрения ассоциации с ПЭ (OR=0,49 и 0,29).

Таблица 1.

Ассоциация генотипов и аллелей полиморфизма -1082G/A гена *IL10* с ПЭ

Генотипы и аллели	Контроль (n=112)	ПЭ (n=168)	χ^2 (p)	OR (95% CI)
Генотип GG	59 (52,7%)	47 (27,9%)	15,07 (0,001)	0,29 (0,13-0,64)
Генотип GA	41 (36,6%)	89 (52,9%)		2,72 (1,60-4,64)
Генотип AA	12 (10,7%)	32 (19,2%)		3,34 (1,55-7,20)
Аллель G	0,710	0,545	15,42 (0,0009)	0,49 (0,34-0,70)
Аллель A	0,290	0,455		2,05 (1,42-2,93)

Примечание: OR – отношение шансов; 95% CI – 95% доверительный интервал.

Значимых различий по данным фоновых значений кровотока в МК между группами не установлено (табл. 2). Однако при попарном сравнении в паре “ПЭ-контроль” скорость кровотока в МК на 30 сек и 1 мин значимо ниже при ПЭ. Тенденция к преобладанию показателя скорости кровотока в МК сохранилась на 2, 3, 4 и 5 мин, но без значимости различий. Вместе с тем, t РГ и $V_{\%увел}$ в условиях ПЭ значимо меньше, чем в контроле.

При попарном сравнении по признаку $V_{\%увел}$ у беременных с ПЭ его значения у гомозигот GG полиморфизма -1082G/A гена *IL10* значимо больше при сравнении с таковыми у носителей генотипа AA. Кроме того, показано, что в группе ПЭ для гомозигот с генотипом GG характерен более высокий уровень t РГ по сравнению с генотипом AA.

Заключение

При ПЭ преобладает носительство аллеля A полиморфизма -1082G/A гена *IL10*, а протективный генотип GG этого полиморфного маркера чаще встречается у здоровых беременных. Нарушение функции эндотелия при ПЭ проявляется снижением показателей t РГ и $V_{\%увел}$. Выраженность эндотелиальной дисфункции при ПЭ зависит от локуса -1082G/A гена *IL10*, где наиболее низкие значения t РГ и $V_{\%увел}$ установлены у носителей генотипа AA.

Таблица 2.

Данные пробы с ПРГ в зависимости от генотипов локуса -1082G/A гена *IL10* (M±SD)

Показатель	ПЭ (n=168)			Контроль (n=112)		
	GG	GA	AA	GG	GA	AA
Фон, см/сек	17,8±2,9	17,6±3,4	17,3±3,2	19,6±4,2	19,8±2,5	19,3±1,7
30 сек, см/сек	20,1±1,3*	19,8±1,8*	19,2±2,0*	23,9±1,6	23,9±2,6	23,1±0,8
1 мин, см/сек	19,5±2,2	19,4±1,2*	18,4±1,5*	22,3±2,0	23,8±0,9	22,1±1,9
2 мин, см/сек	18,9±1,5	17,8±4,2	17,7±1,9	22,1±2,7	22,5±1,7	21,4±2,8
3 мин, см/сек	17,7±3,1	17,3±4,5	16,7±4,1	20,9±2,8	21,6±3,5	19,7±1,1
4 мин, см/сек	17,6±2,7	17,5±2,5	17,1±3,5	19,9±4,1	20,0±2,2	19,2±1,2
5 мин, см/сек	17,3±3,0	17,5±3,3	17,0±3,2	19,2±3,7	19,2±2,7	19,2±4,8
$V_{\%увел}$, %	13,2±0,6*, +	12,3±2,2*	11,3±0,7*, +	21,9±2,7	20,4±2,3	20,1±1,9
t РГ, мин	2,8±0,3*, +	2,3±0,6*	2,2±0,2*, +	4,6±0,9	4,2±1,1	3,9±0,6

Примечание: * - различия между пациентками групп “ПЭ” и “контроль” значимы; + - различия между подгруппой с генотипом GG и подгруппой с генотипом AA значимы.

Zavarin V.V., Radkov O.V., Il'inskaya T.A., Sinyavskaya O.I.

ASSOCIATION OF *IL10* -1082G/A GENE POLYMORPHISM WITH REACTIVITY INDICES OF SKIN MICROVESSELS IN PREGNANT WOMEN WITH PREECLAMPSIA

Tver State Medical Academy, Tver, Russia, vvzavarin@mail.ru.

Summary. Peripheral microcirculation and endothelial function in women with preeclampsia (PE) depending on interleukin-10 (*IL10*) -1082G/A gene polymorphism were studied. 112 women with a normal course of pregnancy and 168 women with PE were evaluated. Peripheral microvascular responses were examined using the ultrasound Doppler flowmetry. The *IL10* -1082G/A gene polymorphism was detected with the use of the PCR. The allele A carrying of the *IL10* -1082G/A gene polymorphism was significantly increased in women who developed PE. The decreased endothelium-dependent vasodilatation in the microcirculation of PE women indicates abnormal endothelial function. Individuals with PE who are A allele carriers of the *IL10* -1082G/A gene polymorphism have most impaired endothelium-dependent vasodilatation. Thus peripheral microcirculation and endothelium function in pregnant women with PE depends on *IL10* -1082G/A gene polymorphism.

Key words: preeclampsia, endothelial dysfunction, gene polymorphism.

УДК 612.018; 612.017

Заморина С.А.

СОВМЕСТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И РЕКОМБИНАНТНОГО ИЛ-2 НА АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, mantissa7@mail.ru

Резюме. Изучено влияние хорионического гонадотропина (ХГ) совместно с рекомбинантным интерлейкином-2 (ИЛ-2) на апоптоз лимфоцитов женщин в системе *in vitro*. Показано, что ХГ (100 МЕ/мл) снижает количество лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза (AnV^-/PI^+), и количество цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), экспрессирующих маркер CD95. В то же время, ИЛ-2 отменяет стимулирующий эффект ХГ(100 МЕ/мл) на количество $CD95^+$Th-лимфоцитов. Таким образом, ХГ регулирует процессы апоптоза, а реализация гормональных эффектов зависит от присутствия ИЛ-2.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, интерлейкин-2, апоптоз.

Введение

Апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель клеток – это естественный механизм, посредством которого плацента удаляет потенциально опасные клетки иммунной системы и тем самым формирует толерантность к фетальному трансплантату [1]. Изучение роли гормонов в формировании причин толерантности является важнейшим направлением репродуктивной иммунологии. Хорионический гонадотропин (ХГ), который продуцируется во время беременности синцитиотрофобластом, играет существенную роль не только в регуляции стероидогенеза плаценты и плода, но и обладает иммуномодулирующим действием [2]. Одновременно с ХГ, трофобласт начинает продуцировать целый спектр цитокинов, среди которых интерлейкин-2 (ИЛ-2) наиболее важен, поскольку необходим для формирования иммунного ответа и является основным аутокринным регулятором дифференцировки и пролиферации лимфоцитов [3]. Таким образом, в гемохориальной области клетки иммунной системы одновременно контактируют с ХГ и ИЛ-2, направленность эффектов которых может быть прямо противоположна. Целью работы была оценка совместного влияния ХГ и ИЛ-2 на апоптоз лимфоцитов женщин в системе *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из венозной крови здоровых небеременных женщин, находящихся в фолликулярной фазе менструального цикла, путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина. ХГ применяли в физиологических концентрациях 10 и 100 МЕ/мл (II-III и I триместр беременности, соответственно) [4]. Рекомбинантный ИЛ-2 ("Sigma", США) применяли в концентрации 100 МЕ/мл [5], соответствующей формированию иммунного ответа. Клетки инкубировали в полной питательной среде 24 ч в условиях 5% CO_2 и 37^{0}C с ХГ и/или ИЛ-2. Экспрессию CD95 (Fas/APO-1) исследовали на $CD3^+CD4^+$- и $CD3^+CD8^+$-лимфоцитах. Апоптоз лимфоцитов оценивали путем окрашивания аннексином-V (AnV-FITC) и йодистым пропидием (PI). Идентифицировали клетки, находящиеся в ранней (AnV^+/PI^-) и поздней стадии (AnV^+/PI^+) апоптоза [6]. Для индукции апоптоза использовали анти-CD3 моноклональные антитела (5 мкг/мл, "Медбиоспектр", Россия). Все измерения проводили на проточном цитофлуориметре ("Becton Dickinson", США). Статистический анализ результатов проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента ($p<0,05$).

Результаты и обсуждение

Установлено, что гормон (100 МЕ/мл) снижает количество лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза (AnV^-/PI^+), но не влияет на показатели позднего апоптоза (AnV^+/PI^+) (таблица). Самостоятельный эффект ИЛ-2 заключается в снижении процента клеток на стадии позднего апоптоза. Совместное применение гормона и цитокина снижает количество лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза, причем проявляется депрессивный эффект низкой дозы ХГ (таблица). Однако, показатели позднего апоптоза не модулируется ХГ при совместном использовании с ИЛ-2. Таким образом, присутствие ИЛ-2 способствует проявлению антиапоптотического эффекта низкой дозы ХГ на показатели раннего апоптоза.

Таблица.

Влияние ХГ на экспрессию мембранного маркера CD95 и апоптоз лимфоцитов женщин в системе *in vitro* (n=7)

Исследуемый показатель	AnV^-/PI^+,% (M ± m)	AnV^+/PI^+,% (M ± m)	$CD3^+CD4^+$ $CD95^+$,% (M ± m)	$CD3^+CD8^+$ $CD95^+$,% (M ± m)
Контроль	24,55 ± 4,26	62,89±6,62	18,78±3,02	27,14±5,63
ХГ 10 МЕ/мл	14,64 ± 6,54	72,78±13,21	25,04±3,78	17,45±3,43 $p<0,01$
ХГ 100 МЕ/мл	15,14 ± 4,23 $p<0,05$	70,69±12,81	32,52±6,64 $p<0,04$	19,34±2,69 $p<0,05$
ИЛ-2 100 Е/мл	26,51±5,79	55,84±5,93 $p<0,05$	27,39±6,90	22,82±5,06
ХГ 10 МЕ/мл +ИЛ-2	17,28±3,92 $p<0,05$	60,37±7,75	22,42±4,49	13,67±1,20 $p<0,04$
ХГ 100 МЕ/мл +ИЛ-2	15,68±3,77 $p<0,05$	63,69±5,47	24,95±5,29	11,02±2,38 $p<0,04$

Установлено, что ХГ снижает количество ЦТЛ, экспрессирующих маркер CD95 ($CD3^+CD8^+CD95^+$), воспроизводя свои эффекты в присутствии ИЛ-2. В то же время, ХГ в высокой дозе повышает количество Th-лимфоцитов, несущих маркер $CD95^+$ ($CD3^+CD4^+CD95^+$), а присутствие ИЛ-2 отменяет этот эффект (таблица).

В целом, ХГ(100 МЕ/мл) снижает количество лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза (AnV^-/PI^+), причем этот эффект не зависит от присутствия ИЛ-2. Помимо этого, ХГ снижает количество $CD95^+$ЦТЛ, действуя синергично с ИЛ-2. Можно предположить, что антиапоптотический эффект ХГ в данном случае касается именно уровня ЦТЛ. Известно, что в период беременности изменяется соотношение регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов в сторону супрессии: увеличивается количество ЦТЛ и уменьшается количество Th-лимфоцитов [2]. Возможно, ХГ вносит свой вклад в повышение уровня ЦТЛ, препятствуя их апоптозу. Таким образом, ХГ является эффективным модулятором процессов апоптоза, и, как след-

ствие - одним из факторов, формирующих иммунологическую толерантность в период беременности.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН ""Молекулярная и клеточная биология".

ЛИТЕРАТУРА

1. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий: монография. – Екатеринбург: УрО РАН, 2009. – 582 с.

2. Ширшев С.В. Механизмы иммуноэндокринного контроля процессов репродукции, в 2 т., Т. 2: монография. – Екатеринбург: УрО РАН, 2002. – 557 с.

3. Hoyer K.K., Dooms H., Barron L., Abbas A.K. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease // Immunol. Rev. – 2008. – V. 226. – P. 19–28.

4. Wide L. An immunological method for the assay of human chorionic gonadotrophin // Acta Endocrinol. – 1962. – V. 41. – P. 1–100.

5. Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages // J. Immunol. – 2003. – V. 171. – P. 4672–4679.

6. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях: Краткое методическое руководство. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. – 59 с.

Zamorina S.A.

COMBINED EFFECTS OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN AND RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 ON T-LYMPHOCYTE APOPTOSIS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, mantissa7@mail.ru

Summary. Combined effect of human chorionic gonadotropin (hCG) and recombinant interleukin-2 (IL-2) on women lymphocyte apoptosis was studied *in vitro*. It was demonstrated that hCG (100 IU/ml) lowered the number of lymphocytes at the early apoptosis stage (AnV^-/PI^+) and the amount of CD95 marker-expressing cytotoxic lymphocytes (CTL). Meanwhile, IL-2 was found to abrogate hCG (100 IU/ml) promoting effect on the quantity of $CD95^+$ Th-lymphocytes. Thus, it appears that hCG regulates the apoptotic processes, and hormone effect realization depends on IL-2 presence.

Key words: chorionic gonadotropin, interleukin-2, apoptosis.

УДК 616-097-055.2

Зуева Е.Б., Тиунова Т.А.

ИЗУЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И УРОВНЕЙ ОНКОМАРКЕРОВ У ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМИ СИНДРОМАМИ ИММУНОПАТОЛОГИИ

Учреждение Российской академии наук Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия, iip@iip.uran.ru

Резюме. Проводили исследование различных параметров иммунной системы и уровней онкомаркеров у подростков и женщин репродуктивного возраста. Выявлено, что у лиц с иммунопатологией в значительном проценте случаев выявляются повышенные уровни онкомаркеров, что создает условия для формирования в последующем у данной группы риска развития онкопатологии. Частота и выраженность изменений в иммунном статусе и уровнях онкомаркеров в г. Магнитогорске была выше, чем в г. Челябинске, что, возможно, обуславливает и более высокий уровень онкологической заболеваемости в данном регионе.

Ключевые слова: иммунологический мониторинг, иммунограмма, онкомаркеры.

Введение

В последнее десятилетие в России произошли глубокие социально-экономические преобразования, повлекшие за собой изменения социального статуса различных слоев населения. Это привело к снижению уровня и качества жизни в популяции и, что более важно, к снижению уровня здоровья. Более выражены эти процессы у жителей техногенных и высокоурбанизированных городов. Среди населения возрастает частота заболеваний, в основе которых лежат те или иные нарушения в иммунной системе, особенно это касается женщин репродуктивного возраста, уровень онкозаболеваний которых неуклонно возрастает.

В связи с этим, одной из основных задач современной иммунологии является комплексная оценка состояния здоровья населения, выявление региональных особенностей формирования иммунопатологии.

Ранее нами были выявлены характерные особенности состояния иммунной системы у больных с различными формами ИДС, аллергическими заболеваниями по сравнению с условно-здоровыми лицами [2,3,4,5]. Полученные данные послужили основой для формирования качественно нового подхода к иммунологическим исследованиям, а именно к созданию системы комплексного иммунологического мониторинга.

Материалы и методы исследования

Иммунологические методы исследования включали специализированный осмотр врача аллерголога-иммунолога и лабораторную диагностику: оценку иммунного статуса и определение уровней онкомаркеров (РЭА, СА 15-3, СА 19-9, СА 242, НСЭ, β2-микроглобулин, β-ХГЧ, ПСА общий и свободный, АФП, тиреоглобулин, кальцитонин, СА-125, ферритин) методом ИФА.

Статистическая обработка материала проводилась по расчету относительных и средних величин, их ошибки и достоверности различия, методами непараметрической и параметрической статистик, с использованием пакета прикладных программ "Statistica for Windows, 6.0" [1.6].

Результаты и обсуждение

У женщин г. Челябинска и г. Магнитогорска произведена оценка не только состояния иммунной системы и уровня онкомаркёров, но и оценен уровень и характер иммунопатологии.

Так, иммунопатология в этих городах соответствовала 4 основным синдромам: аллергическому, аутоиммунному, инфекционному и лимфопролиферативному. При этом важно отметить, что спектр иммунопатологии в этих городах оказался идентичным у женщин, попавших в обследованную выборку. Оценка иммунного статуса выявила четкие различия в состоянии иммунной системы обследуемых лиц в этих городах. Наибольшее число отличий регистрировалось у лиц с аллергической заболеваемостью и комбинированными формами иммунопатологии, наименьшее – у лиц с лимфопролиферативным синдромом иммунопатологии. Очень важно отметить, что при всех изучаемых патологиях были выявлены достоверные отклонения в различных компартментах иммунной системы, включая как основные субпопуляции лимфоцитов, их активационные маркеры, так и фагоцитарное и гуморальное звенья иммунитета.

Одной из причин проведения иммунологического обследования в этих городах явилась высокая онкологическая заболеваемость, особенно в г. Магнитогорске, где она неуклонно растет и среди причин смертности вышла на второе место.

Нами было высказано предположение о том, что онкологическая заболеваемость может быть связана с нарушениями в иммунной системе. Для подтверждения данного предположения было проведено лабораторное обследование с целью выявления уровней онкомаркеров у иммуноскомпроментированных лиц (12 параметров).

Исследование показало, что у иммунологически скомпроментироаванных лиц как в г. Магнитогорске, так и в г. Челябинске в 40 – 50% случаев выявлялся хотя бы 1 повышенный онкомаркер. В то же время в г. Магнитогорске лица с 2-мя и выше выявленными онкомаркерами составили более 30% обследованных, против 10% в г. Челябинске.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о правильности разработанного клинико-иммунологического подхода к выявлению группы риска с иммунологической заболеваемостью с одной стороны, и онкологической – с другой.

Результаты исследования, полученные в гг. Магнитогорске и Челябинске, послужили основой для разработки системы иммунологического мониторинга населения Южно-Уральского региона и формирования компьютерной базы клинико-лабораторного регистра.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Боровиков В.* STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов. (+CD) // В. Боровиков. – СПб.: Питер, 2003. – 688 с.

2. *Зуева Е.Б., Тиунова Т.А., Зурочка В.А. Зурочка А.В.* Определение параметров иммунной системы и уровней онкомаркеров у больных с различными синдромами иммунопатологии // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13. № 4-5. – С. 456–457.

3. *Зурочка А.В., Рябова Л.В., Бастрон А.С.* Три этапа клинико-иммунологического мониторирования // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 1. – С. 43.

4. *Зурочка А.В., Бастрон А.С.* Методические подходы к оценке эффективности медико-социального иммунологического мониторинга при оценке состояния здоровья населения Урало-Сибирского региона // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8. № 2-3. – С. 363.

5. *Зурочка А.В., Зуева Е.Б., Тиунова Т.А., Зурочка В.А.* Выявление онкомаркеров у иммуноскомпроментированных лиц по данным иммунологического мониторинга жителей городов Челябинской области // Дни иммунологии в Сибири. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. В.А.Козлова, С.В.Смирновой, В.Т.Манчука. – Абакан: Издательство ГОУ ВПО Хакасский государственный университет им. Н.Ф.Катанова, 2011. – С. 97–99.

6. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: МедиаСфера, 2003. – С. 14–289.

Zueva E.B., Tiunova T.A.

STADYING OF PARAMETRES OF IMMUNE SYSTEM AND LEVELS THE ONCOLOGICAL MARKERS AT WOMEN WITH VARIOUS SYNDROMES OF IMMUNOPATHOLOGIES

Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Ekaterinburg, Russia, iip@iip.uran.ru

Summary. Carried out research of various parameters of immune system and levels the oncological markers at teenagers and women of reproductive age. It is revealed that at persons with immunopathology in considerable percent of cases the raised levels the oncological markers come to light that creates conditions for formation in the subsequent at the given group of risk of development of oncopathologies. Frequency and expressiveness of changes in the immune status and levels the oncological markers in Magnitogorsk was above, than in Chelyabinsk that probably causes also higher level of oncological disease in the given region.

Key words: immunological monitoring, immunogramma, the oncological markers.

УДК 612-017.1:615.37

Зурочка В. А.,[1] Добрынина М. А.,[1] Костоломова Е.Г.[2]

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ И ВЕЩЕВСТВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СУПЕРНАТАНТОВ CD34+45- КЛЕТОК ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЕМОПОЭЗА

[1]Учреждение Российской академии наук Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия, iip@iip.uran.ru; [2]Тюменский филиал учреждения Российской академии медицинских наук Института клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН, г. Тюмень, Россия, tumiki@mail.ru

Резюме. Изучали иммунотропное, репарационное и антибактериальное действие синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Было выявлено, что пептиды ГМ-КСФ обладают выраженной иммуностимулирующей, репарационной и антибактериальной активностью. Обсуждаются возможные механизмы выявленных эффектов синтетических пептидов.

Ключевые слова: пептиды гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), иммунотропные эффекты, репарация, антибактериальная активность.

Получение новых химических пептидных соединений, обладающих иммуннотропной активностью, является одной из приоритетных задач современной иммунологии. При этом очень важно знать, обладают ли эти препараты дополнительными свойствами, и спектр их активности. Ранее нами было показано [1, 2, 3], что пептиды обладают антибактериальной и иммуностимулирующей активностью. Именно дальнейшему изучению данных и выявлению новых свойств посвящено настоящее исследование.

Целью настоящего исследования явилось выявление новых биологических и иммунотропных эффектов синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ).

Изучали различные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ.

Ранее нами было показано, что синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ стимулировали костно-мозговое кроветворение, пролиферацию и дифференцировку клеток предшественников гранулоцито-монопоэза [4].

Было продолжено исследование различных эффектов синтетических пептидов на различных моделях. Изучали их пролиферативную активность на модели РБТЛ, репарационную активность на модели открытой раны, а также антибактериальную активность на модели бактерицидной активности фракций супернатантов клеток, которую оценивали по общепринятой методике “Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом диффузии в агар с применением бумажных дисков”.

Исследования показали, что полученные синтетические пептиды, помимо основного эффекта (стимуляции костно-мозгового кроветворения), обладают рядом выраженных дополнительных свойств, а именно, более чем в 2 раза ускоряют репарацию ран, при этом раны заживают первичным натяжением с восстановлением кожного и шерстяного покрова, усиливают пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ, по активности сравнимую со стандартным стимулятором – ФГА и такими иммуномодуляторами, как ИЛ2, изменяют активность Т-лимфоцитов *in vitro*. При этом, полученные пептидные соединения одновременно обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении Грам-отрицательных и Грам-положительных бактерий, сравнимых с известными стандартными дефенсинами. Важно отметить, что при комбинировании пептида из активного центра ГМ-КСФ с веществами, полученными из супернатантов CD34+45- клеток предшественников гемопоэза, их антибактериальная активность значительно (более чем в 100 раз) возрастает, при этом происходит потенцирование действия обеих препаратов.

Изучение возможных механизмов антибактериального действия пептидов ГМ-КСФ показало, что они влияют на биопленкообразование бактерий, нарушают их клеточный цикл.

Синтез аланинзамещенных аналогов (замена одной из аминокислот на аланин) приводила к инактивации иммунотропного и антибактериального действия пептидов, что свидетельствует о том, что эффекты связаны с биологически активной молекулой, состоящей из 12 аминокислот в определенной последовательности.

Дальнейшее изучение активности выделенных и синтезированных соединений на модели репарации стандартных ран выявило их выраженное влияние на репаративно-пластические процессы в ране. Так, эти вещества, нанесенные на рану в гелевой основе, стимулировали практически в два раза скорость заживления ран, при этом не происходило образование рубца.

Возможно, такой механизм репарации связан с их плейотропным

действием на различные системы организма и выявленным выраженным антибактериальным эффектом.

Полученные данные свидетельствуют не только о новых свойствах синтетических пептидов ГМ-КСФ, но и расширяют наши представления о возможных механизмах действия данных синтетических соединений.

Таким образом, возможный спектр действия препаратов, с учетом выявленных новых свойств, позволяет применять данные средства не только в иммунологии, но и в других областях медицины, например в хирургической, акушерско-гинекологической и инфекционной практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зурочка А.В., Суховей Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г.* Иммунологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ // Цитокины и воспаление. – 2010. –Т. 9. – № 3. – С. 53.

2. *Зурочка А.В., Суховей Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Костоломова Е.Г.* Плейотропные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ // Вестник уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по аллергологии и иммунологии. – 2010. – № 2/1 (29). – С. 35.

3. *Зурочка А.В., Суховей Ю.Г., Зурочка В.А.,Добрынина М.А, Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г., Аргунова Е.Г., Субботин А.М., Колобов А.А., Симбирцев А.С.* Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9. № 4. – С. 32–34.

4. *Жемчугов В.Е., Зурочка А.В., Румянцев Н.Г.* Стимулятор роста костномозговых клеток человека. Патент №2136308 от 10.09.1999.

Zurochka V.A.,[1] Dobrynina M.A.,[1] Kostolomova E.G.[2]

STADYING OF NEW PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES ISOLATED FROM GM-CSF ACTIVE CENTER AND THE SUBSTANCES RECEIVED FROM SUPERNATANTES OF CD 34+45- CELLS PREDECESSORS OF HEMOPOESIS

[1]Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia, iip@iip.uran.ru; [2]The Tyumen branch of establishment of the Russian Academy of Medical Science of Institute of clinical immunology from Russian Academy of Medical Science, Tyumen, Russia, tumiki@mail.ru

Summary. Studied immunotropian, reparation and antibacterial action of the synthetic peptides isolated from GM-CSF active center. It has been revealed that GM-CSF peptides possess expressed immunostimulation, reparation and antibacterial activity. Possible mechanisms of the revealed effects synthetic peptides are discussed.

Key words: GM-CSF peptides, immunotropian effects , reparation, antibacterial activity.

УДК 612.017.1

Кабановская И.Н., Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Годовалов А.П.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ИНФИЛЬТРАТОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ИММУНОСУПРЕССИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, irenekab7@gmail.com, lebedinska@mail.ru, AGodovalov@gmail.com

Резюме. Исследованы характер, распространённость, клеточный состав лейкоцитарных инфильтратов и иммуногистохимические характеристики составляющих их клеток в печени больных хроническим вирусным гепатитом В и С. Площадь распространения и клеточный состав инфильтратов зависит от вида вируса и активности процесса. Подчёркнута целесообразность иммуногистохимического исследования лейкоцитарных инфильтратов в биоптатах печени больных вирусным гепатитом для уточнения диагноза, прогноза заболевания и выбора оптимального лечения с элементами иммунокоррекции.

Ключевые слова: вирусный гепатит, лейкоцитарная инфильтрация, иммуногистохимические характеристики, иммуносупрессия.

Введение

Местные реакции иммунной системы при вирусных гепатитах проявляются в виде гиперплазии лимфоидной ткани в паренхиме печени. Вслед за развитием в печени воспалительного процесса наблюдаются дистрофические и дегенеративные изменения, некроз гепатоцитов, а затем – коллагенизация стромы на месте гибели участков паренхимы [2]. Данная патология сопровождается изменением состава иммунокомпетентных клеток и нарушением их функций, в результате чего может сформироваться иммунодефицитное состояние [1]. Развитие иммуносупрессорных и иммунопатологических реакций приводит к затруднению элиминации вируса и к хронизации процесса [3]. Для разработки новых методов диагностики и терапии вирусных поражений печени представляется актуальным изучение патологических реакций, приводящих к формированию хронического заболевания.

Цель исследования – выявить морфологические особенности лейкоцитарных инфильтратов в печени, поражённой вирусом гепатита В или С, в зависимости от активности патологического процесса.

Материалы и методы исследования

Исследовались биоптаты печени 37 пациентов с хроническим вирусным гепатитом, среди них 13 – с хроническим гепатитом В (ХГВ) и 24 – с хроническим гепатитом С (ХГС). Диагноз “хронический вирусный гепатит” был поставлен на основании синдромов гепато- и спленомегалии, холестаза и цитолиза. Противовирусная терапия больным до обследования не проводилась. Этиологическая верификация диагноза подтверждалась обнаружением в сыворотке крови серологических маркеров (HBsAg, анти-HBcor IgM, анти-Hbcor суммарные, анти-HCV IgG) с использованием иммуноферментного анализа (ИФА). Определение активности заболевания проводилось общепринятым методом полуколичественной оценки гистологической активности воспалительного процесса и фиброза по Р. Кнодель, адаптированным К. Ишак в отношении гепатитов В и С. Парафиновые срезы биоптатов печени пациентов с различной активностью заболевания (минимальной, низкой, умеренной, высокой) окрашивали гематоксилином-эозином по Ван-Гизону. Иммуногистохимическое исследование проводилось на криосрезах с использованием меченых моноклональных антител к поверхностным маркёрам лимфоцитов (CD3, CD16, CD56, CD4, CD25, CD8, CD20), дендритных клеток (CD1a) и макрофагов (CD14). Использовали двойное окрашивание антителами, меченными флюорохромами — фикоэритрином (PE) и флюоресцеинизотиоционатом (FITC).

Результаты и обсуждение

При минимальной активности хронического процесса в соединительной ткани портальных трактов обнаруживается лимфоцитарная инфильтрация, очень незначительная при ХГВ и более выраженная с наличием бластных форм – при ХГС. Отдельные лейкоциты обнаруживаются в просвете синусоидных капилляров. В стенке некоторых синусоидов выявляются увеличенные в размерах клетки Купфера. Патологический процесс низкой активности в печени, поражённой вирусом гепатита В или гепатита С, также приводит к обширной лейкоцитарной инфильтрации разрастающейся соединительной ткани вокруг триад, состоящей преимущественно из лимфоцитов и незначительного количества зернистых лейкоцитов. Внутри долек обнаруживаются увеличенные клетки

Купфера, отделившиеся от стенок синусоидных капилляров. При ХГС определяются небольшие скопления лимфоцитов внутри долек, а в перипортальных инфильтратах – большое число бластных форм. Морфологические изменения в печени при умеренной активности патологического процесса выражаются в обширной перипортальной лейкоцитарной инфильтрации, которая представлена клетками лимфоидного ряда, а при ХГС – и многочисленными бластными формами. При ХГВ внутри печёночных долек выявляется некоторое количество лейкоцитов, преимущественно лимфоцитарного ряда. В печени больных гепатитом С дольки разобщены на фрагменты, между которыми определяется разросшаяся соединительная ткань, инфильтрированная лимфоцитами. Расширенные внутридольковые синусоидные капилляры и при гепатите В, и при гепатите С заполнены лимфоцитами, макрофагами и активированными купферовскими клетками. У пациентов с высокой активностью хронического процесса в печени, поражённой вирусами гепатита, лимфоидная инфильтрация наблюдается как в разросшейся соединительной ткани в области портальных трактов, так и внутри изменённых печёночных долек. В инфильтратах определяются в основном лимфоциты, бластные формы и макрофаги. Скопления лимфоцитов очень компактные и имеют более чёткие границы, чем при низкой и умеренной активности заболевания. Иммуногистохимические исследования показали, что в инфильтратах печени больных хроническим вирусным гепатитом В или С выявляются преимущественно следующие субпопуляции лимфоцитов: Т-лимфоциты ($CD3^+$), NKT-клетки ($CD3^+/CD16^+/CD56^+$), NK-клетки ($CD16^+/CD56^+$), Т-регуляторные лимфоциты ($CD4^+/CD25^+$), цитотоксические лимфоциты ($CD8^+$).

Заключение

Таким образом, в лейкоцитарных инфильтратах печени больных ХГВ или ХГС преобладают клетки лимфоидного ряда; при активации заболевания среди лейкоцитов появляются в большом количестве бластные формы и макрофаги. Популяция лимфоидных клеток в лейкоцитарных инфильтратах представлена в основном Т-лимфоцитами, NK и NKT-клетками. Площадь распространения и клеточный состав лейкоцитарных инфильтратов в печени больных зависит от вида вируса и активности хронического процесса. У пациентов с гепатитом С наблюдается более обширная лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием бластных форм, чем у больных гепатитом В. Поражение печени вирусом гепатита С приводит не только к появлению инфильтратов перипортальной локализации, но и к появлению большого количества лейкоцитов внутри долек уже при минимальной активности патологического процесса. При проведении морфологического анализа биоптатов печени пациентов с ХГВ и ХГС для диагностики, прогноза заболевания и выбора оптимальной терапии, включая иммунотерапию, целесообразно акцентировать внимание не только на активности фиброза, но и на характеристиках лейкоцитарных инфильтратов в поражённом органе: степени их распространения, характере, клеточном составе, иммуногистохимических особенностях составляющих их клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037р_урал_а и Администрацией Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Meyer zum Buschenfelde K.H.* Immunopathology of chronic liver diseases // Verh. Dtsch. Ges. Pathol. – 1995. – V. 79. – P. 186-197.

2. *Muller M.*, *Blum H.E.*, *Er F.*, *Thimme R.*, *Semmo N.* Cellular immune response in hepatitis C infection: Role of CD154 expression and clinical relevance // Dtsch. Med. Wochenschr. – 2011. – V. 136. № 20. – P. 1073–1077.

3. Weber A., Boege Y.T., Reisinger F., Heikenwдlder M. Chronic liver inflammation and hepatocellular carcinoma: persistence matters // Swiss. Med. Wkly. – 2011. – V. 141. – P. 1–9.

Kabanovskaya I.N., Lebedinskaya O.V., Akhmatova N.K., Godovalov A.P.

CHARACTERISTICS OF LIVER LEUKOCYTIC INFILTRATES IN IMMUNOSUPRESSION INDUCED BY VIRAL HEPATITIS

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, irenekab7@gmail.com, lebedinska@mail.ru, AGodovalov@gmail.com

Summary. The nature, prevalence, cellular composition of leukocyte infiltrates and immunohistochemical characteristics of their constituent cells in the liver of patients with chronic viral hepatitis B and C was investigated. It was found that the area of distribution and cellular composition of infiltrates depended on the virus type and process activity. There is underlined the practicability of leukocyte infiltrates detailed and immunohistochemical study in liver biopsies in patients with viral hepatitis for clarifying diagnosis, prognosis, and choice of optimal treatment with elements of immune correction.

Key words: viral hepatitis, leukocytic infiltration, immunohistochemical characteristics, immunosupression.

УДК 577.15

Корнеева О.С., Черемушкина И.В., Глущенко А.С.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКИХ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ МАННОЗЫ И МАННООЛИГОСАХАРИДОВ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Воронежская государственная технологическая академия”, г. Воронеж, Россия, ospp@vgta.vrn.ru

Резюме. Исследованы пребиотические свойства маннозы и маннoолигосахаридов *in vitro, in vivo*. В результате проведенных медико-биологических исследований иммунного статуса животных определены иммуномодулирующие и иммуностимулирующие свойства маннозы. Изучено влияние маннозы на структуру иммуноглобулинов.

Ключевые слова: маннан, манноза, маннoолигосахариды, пребиотики, иммуноглобулины.

Поиск новых веществ с иммунотропным действием с целью поддержания иммунитета живого организма остается актуальной проблемой [1]. Одним из таких веществ является манноза – эпимер глюкозы. Известно, что снижение уровня маннозы в крови приводит к нарушению углеводной структуры рецепторов в антителах. В чистом виде манноза практически не встречается в пищевых продуктах, а присутствует в виде гомогенных или гетерогенных полисахаридов, которые не гидролизуются кислотами и ферментами желудочно-кишечного тракта человека.

Одним из способов получения маннозы и маннoолигосахаридов является ферментативная деструкция трудногидролизуемых маннанов растительного сырья под действием фермента β-маннаназы. Высокое содержание маннанов в гемицеллюлозе растений позволило разработать метод их выделения [2]. Гидролиз маннанов растительного сырья проводили β-маннаназой микромицета *Trichoderma harzianum* с активностью 2100 ед/г.

Оценка пребиотической активности *in vitro* выявила тенденцию положительного влияния различной концентрации маннозы и маннoолигисахаридов на рост бифидобактерий. Отмечена способность маннозосодержащих компонентов увеличивать резистентность клеток бифидобактерий в присутствии антибиотика широкого спектра действия, а также способность к увеличению симбиотических взаимоотношений *Bifidobacterium bifidum* и *Escherichia coli* – основного представителя микрофлоры желудочно-кишечного тракта, что подтверждает пребиотические свойства маннозы.

В опытах *in vivo* выявлена бифидогенная и лактогенная активность маннозы и маннoолигосахаридов. Применение их в условиях экспериментального дисбиоза, приводило к увеличению количества бифидобактерий до 10^3 КОЕ/г и стимулировало рост молочнокислых бактерий до 10^{11}-10^{12} КОЕ/г.

Результаты по коррекции экспериментального дисбиоза с помощью моносахарида маннозы представлены в таблице.

Таблица.
Микрофлора мышей при введении моносахарида маннозы на фоне дисбактериоза

Микроорганизмы	Количественное выражение микроорганизмов в пробах (КОЕ/г фекалий)		
	Проба №1	Проба №2	Проба №3
контрольное время – 5 сут			
E.coli lac⁺	107	107	107
B. bifidum.	103	103	103
Lactobacillus acidophilus	1011	1011	1011
контрольное время – 10 сут			
E.coli lac⁺	107	106	108
B. bifidum.	103	103	103
Lactobacillus acidophilus	1010	1011	1011
контрольное время – 15 сут			
E.coli lac⁺	106	107	107
B. bifidum.	103	103	103
Lactobacillus acidophilus	1010	1010	1011

Полученные данные свидетельствуют о том, что манноза способствует восстановлению состава и численности индигенной кишечной микрофлоры опытных животных, проявляя тем самым пребиотическую активность [3].

Проведенные медико-биологические исследования иммунного статуса опытных животных при введении в их рацион маннозы и манноолигосахаридов выявили тенденцию их положительного влияния на показатели неспецифического иммунитета опытных животных. Пероральное введение маннозосодержащих компонентов оказывало стимулирующее действие на функциональную активность макрофагов, усиливая поглотительную и переваривающую способность клеток, достоверно повышало активность нейтрофилов при экспериментальном дисбиозе относительно интактных животных, способность индуцировать экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов, а также приводило к снижению фактора некроза опухоли TNF-a, что свидетельствовало об их иммуностимулирующих и иммуномодулирующих свойствах.

Идентификация белкового состава смесей сывороточных иммуноглобулинов мыши, полученных от животных до искусственной инициации дисбиоза, в процессе заболевания, а также после лечения, с введением в рацион маннозы позволила выявить содержание кроме набора иммуноглобулинов класса G в смеси до 20 примесных белков иной природы.

Установлено, что качественный состав структур иммуноглобулинов существенно менялся после применения маннозной диеты. Появлялись четыре новых варианта тяжелых цепей и десять новых вариабельных фрагментов легких. Значительное увеличение (до 48%) числа сиалированных фрагментов в иммуноглобулиновой фракции у мышей после маннозной диеты косвенно свидетельствует об увеличении устойчивости сывороточных белков к клиренсу.

Пребиотические и иммуномодулирующие свойства маннозы и манноолигосахаридов делают очевидной необходимость их включения в состав биологически активных добавок и функциональных продуктов питания.

Работа выполняется в рамках федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009 – 2013 годы (ГК № П1074 от 30.05.2010 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воробьев А.А., Бондаренко В.М., Лыкова Е.В.* и др. Макроэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими препаратами // Вестник РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13–17.

2. *Корнеева О.С., Глущенко А.С., Черемушкина И.В., Черенков Д.А., Слепокуров А.А.* Способ получения маннанов из растительного сырья, патент № 2392332, 2010, Бюл. № 17 от 20.06.2010 г.

3. *Корнеева О.С., Глущенко А.С., Черемушкина И.В., Слепокуров А.А., Михайлова Н.А.* Способ коррекции микрофлоры кишечника, заявка на изобретение № 2009125646, 2011, Бюл. № 2 от 20.01.2011 г.

Korneeva O.S., Cheremushkina I.V., Gluschenko A.S.

THE RESEARCH OF THE PREBIOTIC AND IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF MANNOSE AND MANNOOLIGOSACCHARIDES

Voronezh State Technological Academy, Voronezh, Russia,
ospp@vgta.vrn.ru

Summary. The prebiotic properties of mannose and mannooligisaccharides have been studied *in vitro, in vivo*. The immunomodulatory and immunostimulating properties of mannose have been determined as the result of the medicobiological research of the immune status of animals. The influence of mannose on the immunoglobulins structure has been examined.

Key words: mannan, mannose, mannooligasaccharides, prebiotics, immunoglobulins.

УДК 612.6.057

Ланин Д.В.[1,2], Харахорина Р.А.[1], Лютова Л.В.[2], Долгих О.В.[1,2], Землянова М.А.[1,2], Кирьянов Д.А.[1,2]

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУННОЙ И ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА, ЗАНЯТЫХ НА ПРОИЗВОДСТВЕ АКТИВИРОВАННЫХ УГЛЕЙ

[1]Федеральное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения”, г. Пермь, Россия, dlan@mail.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия

Резюме. Цель работы – оценить особенности иммунной и эндокринной систем у женщин репродуктивного возраста, работающих в условиях воздействия химических факторов на производстве активированных углей. Найдено достоверное увеличение содержания в крови ряда химических элементов и соединений, изменения в эндокринном и иммунном статусах, а также наличие особенностей в их взаимодействии.

Ключевые слова: иммунная и эндокринная системы, химические факторы.

Введение

Имеются хорошо документированные данные о наличии взаимосвязей между эндокринной и иммунной системами [1, 2]. С другой стороны, хорошо известно об изменениях в нейроэндокринном и иммунном статусе под влиянием различных химических факторов, в том числе связанных с профессиональной деятельностью [3, 4]. Однако тема комплексной оценки взаимодействия эндокринной и иммунной систем организма в условиях воздействия химических факторов до настоящего времени разработана недостаточно. Таким образом, цель настоящей работы – произвести гигиеническую оценку особенностей иммунной и эндокринной систем у женщин репродуктивного возраста, работающих в условиях воздействия химических факторов на производстве активированных углей.

Таблица 1.

Некоторые нормированные показатели иммунограммы и содержания ряда гормонов у женщин группы наблюдения

Показатели	Значение
CD3+CD25+-лимфоциты, отн.	2,23***
CD3+CD95+-лимфоциты, отн.	0,73**
CD16+56+-лимфоциты, отн.	-0,54*
Фагоцитарное число	1,40***
Абс. фагоцитоз	1,03***
IgE общий	0,81**
IL-4	0,54*
IL-6	2,14***
IL-8	3,34***
Кортизол	-0,55*
Антитела к тиреоглобулину	4,51***
Антитела к тиреопероксидазе	8,53***
Дегидроэпиандростерон-сульфат	-0,49*

Примечание. Нормированный доверительный интервал: при $p<0,05$ (*) равен 0,46; при $p<0,01$ (**) равен 0,62; при $p<0,001$ (***) равен 0,84; число наблюдений в контрольной группе – 21.

Таблица 2.

Нормированные показатели содержания половых гормонов у женщин группы наблюдения

Гормоны	Фолликулиновая фаза	Лютеиновая фаза
Пролактин	-0,37378	-1,73171**
ЛГ	-0,58069	-0,35678
Прогестерон	1,151327**	4,28032***
ФСГ	0,391378	2,233072***
Эстрадиол	0,050246	1,094803*

Примечание. Нормированный доверительный интервал: для фолликулиновой фазы при $p<0,05$ (*) равен 0,67; при $p<0,01$ (**) равен 0,95; при $p<0,001$ (***) равен 1,38 для числа наблюдений в контрольной группе 11; для лютеиновой фазы при $p<0,05$ равен 0,83; при $p<0,01$ равен 1,23; при $p<0,001$ равен 1,91; число наблюдений в контрольной группе – 8.

Материалы и методы исследования

Обследовано 50 женщин в возрасте от 18 до 45 лет, работающих аппаратчиками на производстве активированного угля (группа наблюдения). Контролем служили показатели 20 сходных по возрасту женщин, не работающих на промышленном производстве и не имеющих на момент обследования соматической патологии. При химико-аналитическом исследовании в каждой пробе крови определяли марганец, никель, хром, медь, фенол, о-, м-, п-крезолы. Исследование иммунного статуса и гормонального фона включало CD-фенотипирование (CD3+-, CD3+CD4+-, CD3+CD8+-, CD3+CD25+-, CD3+CD95+-, CD19+-, CD16+56+-лимфоцитов), определение фагоцитарной активности лейкоцитов, концентрации Ig A, G, M, E, IL-1β, -4, -6, -8, -10, IFN-γ, TNF-α; АКТГ, кортизола, ТТГ, свободных T_3 и T_4, антител к ТГ и к ТПО, дегидроэпиандростерона-сульфата, лептина, пролактина, ЛГ и ФСГ, эстрадиола в сыворотке крови. Оценку концентрации половых гормонов в крови проводили с учетом фазы менструального цикла. Для статистического анализа при оценке содержания в крови химических элементов статистическую достоверность различий оценивали по непарному *t*-критерию Стьюдента. Для оценки изменений в состоянии иммунной и эндокринной систем использовали матричный метод [5, 6]. Изменение взаимодействия иммунной и эндокринной систем оценивали с использованием факторного анализа.

Результаты и обсуждение

У женщин, работающих в условиях воздействия химических факторов, обнаружено статистически значимое увеличение содержания в крови никеля, фенола, м- и п-крезола по сравнению с контрольной группой. Установлено увеличение содержания в крови субпопуляций CD3+CD25+- и CD3+CD95+-лимфоцитов (табл. 1). На этом фоне в функциональном плане наблюдается активация неспецифического фагоцитарного звена иммунной системы, что может быть связано с увеличением концентрации у женщин группы наблюдения нейтрофилактивирующего IL-8 (табл. 1). Одновременно обнаружено снижение числа NK-клеток (табл. 1). Кроме того, найдено увеличение содержания IgE в группе наблюдения с одновременной тенденцией к повышению у женщин этой группы IL-4, являющегося индуктором синтеза IgE (табл. 1). Это свидетельствует об аллергической настроенности организма, на фоне которой отмечается тенденция к увеличению содержания антител к ТГ и ТПО, что может являться маркером формирования аутоаллергии. Также значительные изменения найдены в группе наблюдения в эндокринном статусе (табл. 1, 2). В частности, обнаружено повышение концентрации кортизола и дегидроэпиандростерона-сульфата в группе наблюдения (табл. 1). При анализе нормированных показателей женских половых гормонов по фазам менструального цикла наибольшие изменения обнаружены в лютеиновую фазу (табл. 2). Таким образом, в группе наблюдения имеются особенности иммунного и эндокринного статуса. При рассмотрении данных факторного анализа в контрольной группе было выявлено наличие 2 факторов, группирующих показатели иммунного и эндокринного статуса в лютеиновую фазу, и 3 факторов — в фолликулиновую. В группе наблюдения обнаружено значительно большее число факторов с изменением группировки в них показателей иммунной и эндокринной системы, а, значит, потерей устойчивых физиологических и появлением новых взаимосвязей между системами. При этом ряд факторов включает в себя показатели химической контаминации сыворотки крови, что свидетельствует об обусловленном условиями труда изменении взаимодействия иммунной и эндокринной систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ланин Д.В., Зайцева Н.В., Долгих О.В.* Нейроэндокринные механизмы регуляции функций иммунной системы // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131. – № 2. – С. 122–134.
2. *Webster J.I., Tonelli L., Sternbergx E.M.* Neuroendocrine regulation of immunity // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – V. 20. – P. 125–163.
3. *Zhao M., Chen F., Wang C., Zhang* **Q.**, *Gan* **J.**, *Liu* **W.** Integrative assessment of enantioselectivity in endocrine disruption and immunotoxicity of synthetic pyrethroids // Environmental Pollution. – 2010. – № 158. – P. 1968–1973.
4. *Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. и др.* Активационные и сигнальные маркеры клеточного звена иммунитета в условиях вредного производства // Российский аллергологический журнал. – 2010. – № 5 (1). – С. 97–98.
5. *Златев С.П., Димитров И.Д.* Анализ и оценка иммунного статуса при помощи матричного статистического метода // Иммунология. – 1991. – № 2. – С. 46–49.
6. *Черешнева М.В., Шилов Ю.И., Баданина О.Н., Черешнев В.А., Кеворков Н.Н., Пономарева Т.Б., Шилов С.Ю.* Иммунокоррекция при ранении глаза. – Екатеринбург: УрО РАН, 2001. – 147 с.

Lanin D.V.[1,2], Kharakhorina R.A.[1], Lutova L.V.[2], Dolgikh O.V.[1,2], Zemlyanova M.A.[1,2], Kiryanov D.A.[1,2]

HYGIENIC ESTIMATION OF FEATURES OF IMMUNE AND ENDOCRINE SYSTEMS OF REPRODUCTIVE-AGE WOMEN WORKING IN ACTIVATED CARBONS PRODUCTION

[1]Federal Scientific Centre for Medical and Prophilactic Health Risk Management Technologies, Perm, Russia, dlan@mail.ru;

[2]Perm State National Research University, Russia

Summary. Purpose this work is to estimate the features of immune and endocrine systems of reproductive-age women working under influence of chemical factors in the activated carbons production. A significant increase in blood a content of chemical elements and compounds, changes in the endocrine and immune status, as well as the features of in their interaction is found.

Key words: immune and endocrine systems, chemical factors.

УДК 615.276.2/.4.015.44

Мазунина Л.С.[1], Гаврилова Т.В.[4], Гейн С.В.[1,2], Черешнева М.В.[3], Черешнев В.А.[2,3]

ВЛИЯНИЕ МИЕЛОПЕПТИДОВ НА БАКТЕРИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет", г. Пермь, Россия; [3]Учреждение Российской академии наук Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия; [4]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермская государственная медицинская академия", г. Пермь, Россия

Резюме. Миелопептиды МП-3, МП-5 и МП-6 угнетали индуцированную зимозаном продукцию активных форм кислорода лейкоцитами как при одномоментном внесении, так и в условиях предварительной обработки. При сравнительном анализе разницы в направленности и выраженности эффектов различных миелопептидов выявлено не было, что предполагает наличие единого механизма действия у данной группы пептидных биорегуляторов.

Ключевые слова: миелопептиды, активные формы кислорода, лейкоциты периферической крови.

Введение

В настоящее время очевидным является тот факт, что иммунная система многокомпонентна и ее функционирование обеспечивается сложной сетью взаимосвязанных информационных сигналов, опосредуемых эндогенными информационными субстанциями [1, 2]. Помимо цитокинов, представляющих собой полипептидные макромолекулы, в процессах иммунорегуляции участвуют низкомолекулярные пептиды трёх классов: нейропептиды, пептиды тимуса и пептиды костного мозга (миелопептиды). Миелопептиды представляют собой группу биорегуляторных пептидов костномозгового происхождения, обладающую широким спектром иммуномодулирующей активности [3]. В настоящее время из супернатантов культур клеток костного мозга выделено шесть отдельных миелопептидов (МП-1, МП-2, МП-3, МП-4, МП-5, МП-6), модулирующих функции как адаптивного, так и врождённого иммунитета [1]. Цель настоящей работы – исследовать влияние миелопептидов МП-3, МП-5 и МП-6 на продукцию активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α лейкоцитами периферической крови при различных вариантах внесения миелопептидов в культуры.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования продукции активных форм кислорода использовали нефракционированные лейкоциты периферической крови здоровых доноров добровольцев в возрасте от 20 до 22 лет. Нефракционированную лейкоцитарную взвесь получали путем отстаивания гепаринизированной венозной крови в течение 2 часов при 37°С. Оценка кислородзависимой микробицидной активности лейкоцитов осуществлялась с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах ("Greiner", Германия), каждая лунка содержала 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 и 1500 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовали люминол (10^{-5} М). Регистрация результатов велась в течение часа с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия). Статистическая обработка данных производилась с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В варианте одномоментного внесения миелопептидов с индуктором в лейкоцитарных культурах, стимулированных зимозаном 150 мкг/мл, все исследуемые миелопептиды, начиная с 25 мин реакции, проявляют угнетающее действие на продукцию активных форм кислорода. В присутствии зимозана 1500 мкг/мл миелопептиды угнетают синтез кислородных радикалов с 15-й по 60-ю мин реакции. Эффектов миелопептидов на спонтанную ЛЗХЛ в лейкоцитарной взвеси не обнаружено. В условиях предварительной обработки лейкоцитов миелопептидами динамика спонтанной ЛХЗЛ лейкоцитов не изменяется, в активированных зимозаном 150 мкг/мл культурах продукция активных форм кислорода под воздействием миелопептидов выражено ингибируется с 15 по 60 мин реакции, а в культурах с концентрацией зимозана 1500 мкг/мл - на 50-й и 60-й мин реакции.

Таким образом, миелопептиды МП-3, МП-5 и МП-6 угнетают продукцию активных форм кислорода активированными лейкоцитами периферической крови. В условиях предварительной обработки клеток влияние миелопептидов на продукцию активных форм кислорода было выражено в меньшей степени. Ранее нами была показана способность миелопептидов угнетать ЛПС-индуцированную продукцию IL-1β, фагоцитарную активность нейтрофилов [4] и ФГА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов периферической крови *in vitro* [5, 6]. В то же время, в литературе есть данные о стимулирующем влиянии МП-3 на фагоцитарную активность макрофагов [7], а также об усилении в присутствии МП-3 антигенпрезентирующей способности незрелых дендритных клеток [8]. При сравнительном анализе разницы в направленности и выраженности эффектов различных миелопептидов выявлено не было, что предполагает наличие единого механизма действия у данной группы пептидных биорегуляторов.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал-а № 10-04-96021 и программой Президиума УрО РАН "Фундаментальные науки – медицине".

ЛИТЕРАТУРА

1. *Петров Р.В., Михайлова А.А., Фонина Л.А., Степаненко Р.Н.* Миелопептиды. – М.: Наука, 2000. – 181 с.
2. *Черешнева М.В., Шилов Ю.И., Черешнев В.А. и др.* Иммунокоррекция в комплексном лечении больных с воспалительными заболеваниями роговой и сосудистой оболочек глаза. – Екатеринбург: УрО РАН. – 2005. – 253 с.
3. *Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E. et al.* // Regulatory Peptides. – 1994. – V. 53. – P. 203–209.
4. *Гаврилова Т.В., Гейн С.В.* Иммуномодулирующие эффекты миелопептидов при экспериментальном проникающем ранении глаза. – Екатеринбург, 2004. – 101 с.
5. *Гаврилова Т.В., Гейн С.В., Погудина Т.А., Черешнев В.А.* Механизм влияния миелопептидов на пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140. № 7. – С. 85–87.
6. *Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Черешнев В.А., Черешнева М.В.* Влияние миелопептидов на пролиферацию лимфоцитови продукцию IL-1β и TNF-α мононуклеарами, моноцитами и нейтрофилами // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7. № 1. С. 24–28.
7. *Априкян В.С., Михайлова А.А., Петров Р.В.* Повышение под влиянием миелопептида-3 антигенпредставляющей функции макрофагов // Иммунология. – 2000. – № 2. – С. 21–23.
8. *Хомякова А.В., Москалева Е.Ю., Фонина Л.А., Михайлова А.А.* Влияние иммунорегуляторного миелопептида-3 на активность дендритных клеток человека // Иммунология. – 2007. – № 5. – С. 285–289.

Mazunina L.S.[1], Gavrilova T.V.[4], Gein S.V.[1,2], Chereshneva M.V.[3], Chereshnev V.A.[2,3]

EFFECT OF MYELOPEPTIDES ON REACTIVE OXYGEN SPECIES' GENERATION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia; [2]Perm State National Research University, Perm, Russia; [3]Institute of Immunology and Physiology, Yekaterinburg, Russia; [4]Perm State Medical Academy, Perm, Russia

Summary. Myelopeptides MP-3, MP-5, and MP-6 were found to suppress zymosan-induced production of reactive oxygen species by leukocytes both under one-way introduction and under pretreatment. Using comparative analysis the difference in direction and expressivity of effects of various myelopeptides was not revealed that suggests the existence of common mechanism of action in this group of peptide bioregulators.

Key words: myelopeptides, reactive oxygen species, peripheral blood leucocytes.

УДК 612.662+616.155.3]-097

Маркова В.А., Савочкина А.Ю., Пегушина И.В., Шишкова Ю.С.

ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК АКТИВИРОВАННЫМИ И НЕАКТИВИРОВАННЫМИ НЕЙТРОФИЛАМИ СЛЮНЫ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН В I И II ФАЗУ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Челябинск, Россия, kanc@chelsma.ru.

Резюме. В статье представлены результаты исследования количества нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в слюне у здоровых женщин в зависимости от фазы менструального цикла, а также влияния препарата пирогенал и ФМА на процесс образования НВЛ. Установлено, что во II фазу менструального цикла происходит увеличение образования нейтрофильных внеклеточных ловушек при сравнении с показателями слюны у женщин в I фазу менструального цикла. Определено, что пирогенал и ФМА индуцируют процесс формирования внеклеточных ловушек.

Ключевые слова: слюна, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Введение

Слюна – это наиболее доступная и стабильная биологическая жидкость. По общему признанию диагностическое использование слюны для оценки секреторного иммунитета является весьма перспективным в связи с неинвазивным способом взятия исследуемого материала [1]. В слюне присутствует постоянная микрофлора и продукты ее метаболизма, а также спущенные эпителиальные клетки и нейтрофилы, мигрировавшие в полость рта главным образом через десну.

Нейтрофилы являются важными эффекторными клетками врожденной иммунной системы. Недавно был описан новый противомикробный механизм у нейтрофилов, который заключается в способности активированных нейтрофильных гранулоцитов образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) [2], которые состоят из нуклеиновых кислот и биологических компонентов гранул нейтрофильных гранулоцитов.

Цель работы – оценить способность нейтрофильных гранулоцитов к образованию НВЛ в слюне у здоровых женщин в I и II фазу менструального цикла.

Материалы и методы исследования

За период с 2010 по 2011 годы на базе Научно-исследовательского института иммунологии Челябинской государственной медицинской академии были обследованы 30 здоровых женщин в первую и вторую фазу менструального цикла с отсутствием заболеваний ротовой полости. У всех женщин была забрана смешанная слюна. Забор материала проводился в одноразовые пробирки в объеме 2 мл, с добавлением 1 мл физиологического раствора в течение 5 минут, через 1 час после еды.

Для оценки количества внеклеточных ловушек полученная суспензия в равном объеме смешивалась со сложным красителем, который готовился *ex tempore*: 1 мл синьки Эванса в концентрации 1:8000 смешивался с 1 мл красителя Sytox Green в концентрации 1:500. Из окрашенного материала готовился препарат “раздавленная капля”. Учет проводился с помощью люминесцентного микроскопа. Были выделены следующие группы: 1 группа объединила жизнеспособные клетки ярко-оранжевого цвета, 2 группа включала клетки, подвергшиеся апоптозу (клетки с зеленым ядром и ярко-оранжевой цитоплазмой), 3 группа объединяла погибшие клетки зеленого цвета и к 4 группе относили свободнолежащие ярко-зеленые волокна, представляющие собой нити ДНК нейтрофилов (нейтрофильные внеклеточные ловушки). Проводился подсчет 100 структур разных групп и определялось процентное содержание каждой морфологической единицы. Для активации нейтрофилов, содержащихся в слюне, нами применялись пирогенал – липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi* (концентрация подбиралась в соответствии со средней терапевтической дозой организма человека), и форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), который использовался в концентрации 7,5 μМ. Пробы инкубировались при температуре 37^{0}С 30 минут, в качестве контроля выступала слюна, инкубировавшаяся в тех же условиях.

Полученные результаты исследования были обработаны методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm м$). Для расчетов применялся непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что во II фазе менструального цикла в слюне здоровых женщин наблюдается достоверное увеличение количества нейтрофильных внеклеточных ловушек по сравнению с показателями у женщин в I фазе менструального цикла. Одной из возможных причин может служить тот факт, что у женщин во II фазу менструального цикла происходит изменение гормонального фона, а именно увеличение концентрации половых гормонов, которые оказывают влияние на показатели функциональной активности лейкоцитов слизистых оболочек.

После активации пирогеналом и ФМА наблюдалось статистически значимое увеличение количества нейтрофильных внеклеточных ловушек более чем в два раза по сравнению с группой без активации. При этом также наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток в два раза. Из чего можно сделать вывод о том, что количество нейтрофильных внеклеточных ловушек увеличивалось за счет их образования из жизнеспособных клеток, присутствующих на слизистой оболочке ротовой полости (таблица).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Тотолян А.А.* Современный подход к диагностике иммунопатологических состояний. // Мед. иммунол. – 1999. – Т. 1. № 1-2. – С. 75–109.
2. *Brinkmann V. et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria // Science. – 2004. – P. 1532–1535.

Markova V.A., Dolgushin I.I., Savochkina A.J., Pegushina I.V., Shishkova Y.S.

EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION BY ACTIVATED AND NONACTIVATED SALIVARY NEUTROPHILS IN HEALTHY WOMEN AT I AND II PHASE OF THE MENSTRUAL CYCLE

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia, kanc@chelsma.ru

Summary. Investigations of neutrophil extracellular traps (NET) formation in the saliva of healthy women depending on the phase of the menstrual cycle, as well as the influence of the drug pyrogenal and PMA on the NET formation are presented. An increase in neutrophil extracellular traps formation in the saliva of women in the II phase of the menstrual cycle as against I phase of the menstrual cycle was established. Induction of the NET formation with the pyrogenal and PMA was determined.

Key words: saliva, neutrophils, neutrophil extracellular traps.

Таблица.

Изучение влияния пирогенала и ФМА на образование внеклеточных ловушек нейтрофилами слюны у здоровых женщин ($M \pm м$)

		№ гр	n	Живые, %	Мертвые, %	Апоптоз, %	НВЛ, %
Женщины I фаза менструального цикла	Слюна + физ. р-р.	1	15	23,36±3,68	5,55±1,45	61,55±3,66	9,27±0,86
	Слюна + пирогенал	2	15	11,36±1,26 p_{1-2}=0,004	10,64±2,32	52,64±3,28	25,18±2,46 p_{1-2}=0,00009
	Слюна + ФМА	3	15	9,27±3,7 p_{1-3}=0,001	7,64±1,85	56,09±3,07	27,09±2,77 p_{1-3}=0,00008
Женщины II фаза менструального цикла	Слюна + физ. р-р.	4	15	24,18±3,88	6,64±1,24	52,91±2,98	16,09±1,38 p_{1-4}=0,002
	Слюна + пирогенал	5	15	11,36±2,4 p_{4-5}=0,005	4,45±1,17	54,18±2,62	29,55±2,22 p_{4-5}=0,0004
	Слюна + ФМА	6	15	9,36±1,69 p_{4-6}=0,002	5,73±1	51,09±3,09	34±1,71 p_{4-6}=0,00007

УДК 612.018–612.017

Некрасова И.В.

ВЛИЯНИЕ ЭСТРИОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, nirina5@mail.ru

Резюме. Исследовано влияние эстриола (E_3) на активность клеток врожденного иммунитета больных рассеянным склерозом (РС). E_3 угнетает фагоцитарную активность нейтрофилов и усиливает активность индоламин-2,3-диоксигеназы моноцитов. В целом, гормон оказывает более значимый эффект на клетки больных РС в сравнении со здоровыми донорами и может являться потенциальным иммуномодулятором в лечении данного аутоиммунного заболевания.

Ключевые слова: рассеянный склероз, эстриол, фагоцитоз, индоламин-2,3-диоксигеназа.

Введение

Поскольку состояние беременности связывают со смещением баланса Т-хелперов (Th) с 1 типа на 2, у беременных происходит улучшение течения Th1-опосредованных аутоиммунных заболеваний [1], одним из которых является рассеянный склероз (РС). В основе данной патологии лежит аутоиммунный процесс, характеризующийся иммунным ответом в отношении собственного белка миелина и разрушением нервных волокон при участии Т-лимфоцитов и макрофагов [2]. При этом известно, что одним из механизмов формирования иммунологической толерантности при аутоиммунных заболеваниях является активация индоламин-2,3-диоксигеназы [3], которая кроме того может способствовать генерации Т-регуляторных лимфоцитов [4].

Эстриол (E_3) называют “гормоном беременности”, поскольку у небеременных женщин он практически не определяется, а для его синтеза необходима скоординированная работа ферментативных систем как матери, так и плода [5]. Принимая во внимание тот факт, что при беременности меняется гормональный баланс, а продукция E_3 существенно возрастает, данный гормон является одним из вероятных кандидатов на роль фармпрепарата при аутоиммунных заболеваниях, связанных с повышенной активностью Th1-клеток. Недавно продемонстрирован благоприятный эффект от применения E_3 в экспериментальной модели РС у мышей [6, 7]. Однако данные исследования единичны и требуют дальнейшего рассмотрения.

Цель настоящей работы – оценка влияния E_3 на активность индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) моноцитов и фагоцитарную активность нейтрофилов больных РС в сравнении со здоровыми донорами.

Материалы и методы исследования

В работе использованы сепарированные лейкоциты периферической венозной крови здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста, а также больных РС. Для выделения нейтрофилов и мононуклеаров периферической крови (МПК) использовали градиент плотности фиколл-верографина. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли после часовой инкубации с E_3 по степени снижения свечения люминесцентного генно-инженерного штамма бактерий *E. coli lux*$^+$ при их поглощении клетками [8]. Для оптимального выражения результатов исследования рассчитывали индекс фагоцитарной активности (ИФА), отражающий процент гашения биолюминесценции в сравнении с исходным уровнем. Таким образом, ИФА = 100 x $(X_1-X_2)/X_1$, где X_1 – интенсивность биолюминесценции контрольной пробы (бактерии), X_2 – опытной пробы (бактерии + фагоциты). МПК культивировали в растворе Хенкса, содержащем триптофан, в течение 4 часов. Активность IDO в МПК определяли спектрофотометрически по изменению концентрации кинуренина [9] – первого стабильного метаболита пути распада триптофана. Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

Таблица.

Модуляция активности IDO под влиянием E_3

	Концентрация кинуренина, мкМ		
	Контроль	E_3 (2 нг/мл)	E_3 (20нг/мл)
Здоровые доноры	7,14±0,516	9,16±0,639*	10,54±0,449*
Больные РС	5,03±0,549	5,50±0,317	11,42±0,947*

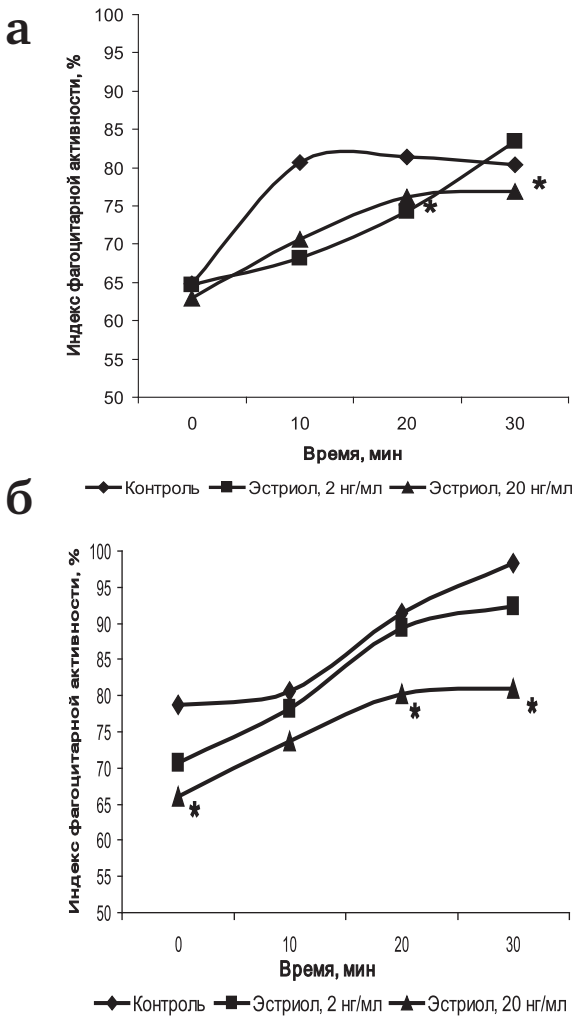


Рис. 1. Влияние E_3 на фагоцитарную активность нейтрофилов. Примечание: а – здоровые доноры, б – больные РС; здесь и далее: * – $p<0,05$ в сравнении с контролем, # – $p<0,05$ в сравнении со здоровыми донорами.

Результаты и обсуждение

Одним из показателей функционирования Th1-системы может служить оценка фагоцитарной активности. Установлено, что изначальный уровень ИФА больных РС был выше, чем у здоровых доноров. Часовая инкубация нейтрофилов здоровых доноров с E_3 в концентрации, соответствующей I триместру беременности, снижала фагоцитарную активность нейтрофилов на 20-й мин, а в концентрации, соответствующей III триместру, – на 30-й мин (рис. 1а). ИФА клеток больных РС снижался под влиянием E_3 в концентрации, соответствующей III триместру беременности, на протяжении практически всей динамики исследования (рис. 1б).

Одним из факторов, способствующих поддержанию периферической толерантности, является экспрессия IDO антигенпрезентирующими клетками, к которым, в частности, относятся моноциты периферической крови. Данный фермент катаболизирует триптофан, что, в свою очередь, приводит к гибели цитотоксических лимфоцитов вследствие дефицита необходимой для их активности аминокислоты и выделения побочных продуктов ее деградации. Установлено, что E_3 вне зависимости от концентрации усиливает активность IDO в МПК здоровых доноров. Исходная активность IDO больных РС была ниже, чем здоровых доноров. Однако под влиянием E_3 в концентрации, соответствующей III триместру беременности,

активность IDO повышалась, причем даже в большей степени, чем у здоровых доноров (таблица).

Выводы

Таким образом, E_3 угнетает фагоцитарную активность нейтрофилов и усиливает активность IDO больных РС. Данный гормон способствует формированию толерогенного фенотипа данных клеток и может являться потенциальным иммуномодулятором в лечении такого аутоиммунного заболевания, как РС.

Работа поддержана грантом молодых ученых Уральского отделения РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lorenzi A.R.*, *Ford H.L.* Multiple sclerosis and pregnancy // Postgrad. Med. J. – 2002. – V. 78. – P. 460–464.

2. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated attack against myelin in the central nervous system // Cell. – 1996. – V. 85. № 3. – P. 299–302.

3. *Terness P.*, *Chuang J.*, *Bauer T.*, *Jiga L.*, *Opelz G.* Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)–producing dendritic cells: too much ado about IDO? // Blood. – 2005. V. 105. № 6. – P. 2480–2486.

4. *Chen W.*, *Liang X.*, *Peterson A.J.* The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation // J. Immunol. – 2008. – V. 181. № 8. – P. 5396–5404.

5. *Kase N.G.*, *Reyniak J.V.* Endocrinology of pregnancy // Mount Sinai J. Med. – 1985. – V. 52. – P. 11–34.

6. *Jansson L.*, *Olsson T.*, *Holmdahl R.* Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice // J. Neuroimmunol. – 1994. – V. 53. – P. 203–207.

7. *Palaszynski K.M.*, *Liu H.*, *Loo K.K.*, *Voskuhl R.R.* Estriol treatment ameliorates disease in males with experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis // J. Neuroimmunol. – 2004. – V. 149. № 1–2. – P. 84–89.

8. Ширшев С.В., Куклина Е.М., Заморина С.А., Никитина Н.М., Некрасова И.В. Способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови человека по степени гашения биолюминесценции // Патент на изобретение РФ 2292553. Заявка № 2005118124/15. Приоритет изобр. от 10.06.2005. Зарег. В Госреестре изобр. 27.01.2007.

9. *Braun D.*, *Longman R.S.*, *Albert M.L.* A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation // Blood – 2005. – V. 106. № 7. – P. 2375–2381.

Nekrasova I.V.

THE INFLUENCE OF ESTRIOL ON THE INNATE IMMUNITY CELL ACTIVITY AT MULTIPLE SCLEROSIS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS,

Perm, Russia, nirina5@mail.ru

Summary. The influence of estriol (E_3) on innate immunity cell activity in multiple sclerosis (MS) patients was investigated. E_3 depressed the neutrophil phagocyte activity and increased monocyte indoleamine-2,3-dioxygenase activity. Generally, the hormone had more significant effect on cells in MS patients than in healthy ones, and could be a potential immunomodulator in treatment of this autoimmune disease.

Key words: multiple sclerosis, estriol, phagocytosis, indoleamine-2,3-dioxygenase.

УДК 504.064

Никитин О.В., Степанова Н.Ю., Латыпова В.З.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИФА ДЛЯ СКРИНИНГА ЦИАНОТОКСИНОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМАХ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования

“Казанский (Приволжский) федеральный университет”, г. Казань, Россия, nikitin-kfu@mail.ru

Резюме. Показано, что применение иммуноферментного анализа для идентификации цианотоксинов позволяет определить их присутствие без привлечения дорогостоящих аналитических приемов. Было выявлено, что суммарное содержание микроцистинов в пробах воды, отобранных в зоне водозабора и в местах активного рекреационного использования, находится в диапазоне от допустимого до высокого уровня (0,25–5,72 мкг/л) по классификации ВОЗ.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, сине-зеленые водоросли, цианотоксины, микроцистины.

К числу глобальных процессов, резкое возрастание скорости которых отмечено в последние десятилетия, можно отнести процесс антропогенного эвтрофирования [1], который в современных условиях выступает доминирующим фактором ухудшения качества воды [2].

С процессами эвтрофирования связаны и другие неблагоприятные последствия для водных экосистем, например, сопутствующее массовое развитие сине-зеленых водорослей (цианобактерий). Так называемое “цветение” приводит к ухудшению органолептических качеств воды – появляется неприятный вкус и запах, изменяется ее цвет. Отмирание водорослей и их последующее разложение приводит к резкому снижению концентрации растворенного кислорода, особенно в придонных слоях воды, что вызывает замор рыб и гибель других гидробионтов. Опасность развития сине-зеленых водорослей связана с выделением цианотоксинов, которые губительно действуют на водную флору и фауну. Имеются литературные данные о том, что цианотоксины могут приводить к аллергическим реакциям, отравлениям и даже гибели людей [3, 4, 5].

Разнообразие цианотоксинов, выделяемых сине-зелеными водорослями (*Microcystis* и *Nodularia* spp. и др.), чрезвычайно высоко. Например, только вариаций микроцистинов (рисунок), обладающих острым гепатотоксическим эффектом, существует около 70.

Присутствие цианотоксинов в воде можно выявить различными способами, как косвенными, например, при помощи микроскопирования проб воды и идентификации в них представителей цианобактерий, так и прямыми аналитическими методами качественного и количественного анализа. К числу последних относятся методы, основанные на ингибировании протеин фосфатаз, ПЦР-диагностике, хроматографии, иммуноферментый анализ (ИФА) [6]. При этом последний способ имеет ряд важных преимуществ: экспрессность, высокая специфичность реакции, возможность обнаружения в нанодиапазоне концентраций, низкая стоимость и др., что позволяет рекомендовать его для проведения скрининга цианотоксинов в поверхностных водоемах, используемых в питьевых и рекреационных целях.

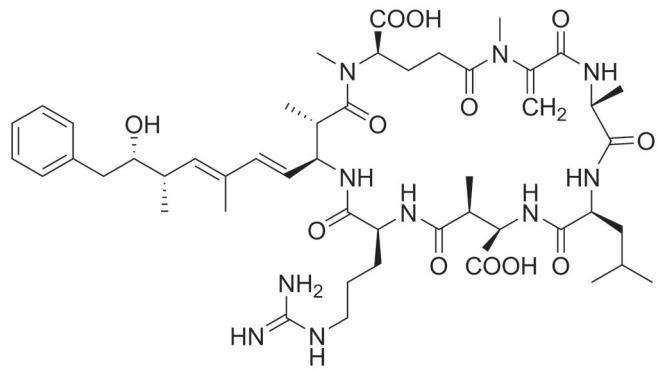


Рисунок. Структурная формула микроцистина-LR, выделяемого *M. aeruginosa* Kützing, 1846.

Исследование содержания цианотоксинов проводилось в пробах воды, отобраных в августе 2011 г., в период массового развития во-

дорослей на 4 водных объектах в пределах Республики Татарстан: р. Кама (у г. Лаишево), р. Меша (в средней части), оз. Нижний Кабан (в центральной части г. Казани) и Куйбышевское водохранилище (район водозабора г. Казани и рекреационная зона у н.п. Нижний Услон).

Для определения суммарной концентрации свободных токсинов (микроцистинов) использовалась коммерческая тест-система *Microcystins/Nodularins (ADDA) ELISA Kit* (*PN* 520011, *Abraxis*), с последующей регистрацией на иммуноферментом анализаторе УНИПЛАН (АИФР-01). Полученные результаты представлены в таблице.

Таблица.

Суммарная концентрация микроцистинов (мкг/л) в пробах воды.

Куйбышевское водохранилище			р. Кама	р. Меша	оз. Н.Кабан	Норматив ВОЗ
Район Волжского водозабора	Н.Услон, станция 1	Н.Услон, станция 2				
1,48±0,21	0,71±0,27	5,72±1,02	0,50±0,24	0,45±0,03	1,52±0,13	1,0

Проведенное исследование выявило превышение рекомендуемых ВОЗ нормативов для суммарного содержания микроцистинов на станциях: н.п. Н.Услон (5,72±1,02) – пятикратное превышение, оз. Н.Кабан (1,52±0,13) и район Волжского водозабора г. Казани (1,48±0,21) – превышение нормативов в 1,5 раза. Последний факт вызывает особую тревогу, т.к. микроцистины плохо устраняются при стандартных процедурах водоподготовки и могут воздействовать напрямую через питьевую воду на здоровье населения. Самыми благополучными водоемами в отношении цианотоксинов являются реки Меша и Кама, где уровень содержания микроцистинов соответствует допустимому.

Таким образом, проведенные исследования показали высокую эффективность ИФА методов для скрининга цианотоксинов в поверхностных водоемах и могут применяться для оценки экологической опасности в условиях массового развития водорослей в водоемах питьевого и рекреационного назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. РД 52.24.620-2000. Охрана природы. Гидросфера. Организация и функционирование подсистемы мониторинга антропогенного эвтрофирования пресноводных экосистем.

2. *Sundergaard M. et al*. Lake restoration: successes, failures and long-term effects // Journal of applied ecology. – 2007. – V. 44. – P. 1095–1105.

3. *Zaccaroni A*. Toxicity of fresh water algal toxins to humans and animals // Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection. – Dordrecht: Springer, 2008. – P. 45–89.

4. *Vasconcelos V*. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help // Limnetica. – 2006. – V. 25. – №1-2. – P. 425–432.

5. *Azevedo S.M.F.O. et al*. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil // Toxicology. – 2002. – V. 181–182. – P. 441–446.

6. *Hawkins P.R. et al*. A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment // Journal of water supply: research and technology. – 2005. – V. 54. – P. 509–518.

Nikitin O.V., Stepanova N.Yu., Latypova V.Z.

ELISA SCREENING ASSAY FOR CYANOTOXINS IN WATER BODIES

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia, nikitin-kfu@mail.ru

Summary. The results of present research demonstrated that application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of cyanotoxins allows to define their presence in surface water bodies. The total content of microcystins in a recreation and water intake zones varied in the range 0.25–5.72 ug l^{-1} (in some cases exceeding the WHO guideline values).

Key words: ELISA, blue-green algae, cyanotoxins, microcystins.

УДК 612.018:612.017

Орлова Е.Г.

ВЛИЯНИЕ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА НА СИНТЕЗ ИНТЕРФЕРОНА-γ И ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, orlova_katy@mail.ru

Резюме. Изучены эффекты лептина и грелина в концентрациях, сопоставимых с содержанием гормонов в периферической крови по триместрам беременности, на внутриклеточный синтез интерферона-γ (INF-γ) и интерлейкина-4 (IL-4) Т-лимфоцитами периферической крови *in vitro*. Установлено, что грелин вне зависимости от дозы не влиял на процессы трансляции INF-γ, но стимулировал внутриклеточный синтез IL-4 $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитами. Лептин в исследуемых дозах не оказывал влияния на синтез изучаемых цитокинов Т-лимфоцитами. При совместном внесении гормонов выявлялся только стимулирующий эффект грелина в отношении синтеза IL-4 $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитами, эффектов синергизма или антагонизма с лептином выявлено не было. Таким образом, грелин в концентрациях, характерных для беременности, усиливает процессы трансляции IL-4 $CD4^+$- и $CD8^+$ Т-лимфоцитами периферической крови.

Ключевые слова: лептин, грелин, Т-лимфоциты, интерферон-γ, интерлейкин-4.

Введение

Лептин и грелин являются пептидными гормонами, которые играют важную роль в регуляции репродуктивных процессов и иммунных реакций при беременности. Нарушение баланса этих гормонов сопряжено с дефектами репродуктивной функции вследствие срыва механизмов иммунологической толерантности [1]. INF-γ и IL-4 являются ключевыми цитокинами, продуцируемыми Т-хелперами (Th), определяющими девиацию иммунного ответа по Th1 или Th2-типу [2]. Одним из наиболее важных механизмов формирования иммунологической толерантности при беременности является смещение акцента иммунных реакций по Th2-типу [2]. Поэтому изучение влияния лептина и грелина на продукцию INF-γ и IL-4 Т-лимфоцитами важно для понимания роли гормонов в Th-девиации при беременности.

Цель работы – изучить влияние лептина и грелина, а также их совместные эффекты в концентрациях, отражающих уровень гормонов в периферической крови при беременности, на синтез INF-γ и IL-4 Т-лимфоцитами в системе *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Суспензию мононуклеарных клеток периферической крови здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографина. Полученную суспензию культивировали в полной питательной среде (среда 199 с добавлением 10 mM HEPES; 2 mM L-глутамина; 100 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки) с гормонами при 37^{0}C в условиях 5% CO_2 в течение суток. Лептин (“Sigma”, США) в культуры вносили в дозах 10 и 35 нг/мл, отражающих его содержание в периферической крови в I и во II-III триместрах беременности соответственно [3]. Грелин (“Sigma”, Израиль) использовали в концентрациях 1,25 и 0,83 нг/мл, соответствующих уровню гормона в периферической крови в I-II и III триместрах беременности [4]. Для изучения совместных эффектов лептин и грелин вносили в культуры одномоментно в сочетаниях, характерных для I-II (лептин 10 нг/мл + грелин 1,2 нг/мл) и II-III (лептин 35 нг/мл + грелин 0,87 нг/мл) триместров беременности. В контрольные пробы вместо гормонов добавляли равное количество их растворителя (изотонический хлорид натрия). Для активации внутриклеточного синтеза цитокинов в культуры добавляли форболмиристатацетат и иономицин, а также блокаторы внутриклеточного транспорта брефелдин А и монексин (Cell Stimulation Cocktail, eBioscience) в соответствии с методикой производителя. Детекцию внутриклеточной выработ-

Таблица.

Влияние лептина и грелина на синтез INF-γ и IL-4 Т-лимфоцитами периферической крови

Экспериментальное воздействие	N	Процентное содержание Т-лимфоцитов, продуцирующих INF-γ или IL-4			
		$CD4^+INF\text{-}\gamma^+$	$CD4^+IL\text{-}4^+$	$CD8^+INF\text{-}\gamma^+$	$CD8^+IL\text{-}4^+$
Контроль	6	1,523±0,605	1,336±0,31	1,528±0,47	1,841±0,62
Лептин (10 нг/мл)	6	2,311±0,909	1,933±0,506	1,819±0,744	2,445±0,991
Лептин (35 нг/мл)	6	1,396±0,572	2,786±0,964	1,376±0,362	2,718±0,905
Грелин (1,2 нг/мл)	6	2,805±1,161	3,453±1,09 p=0,006	1,756±0,93	3,604±0,876 p=0,016
Грелин (0,87 нг/мл)	6	2,993±1,537	4,545±1,711 p=0,003	2,43±0,856	4,918±0,729 p=0,0005
Лептин + Грелин (10 нг/мл + 1,2 нг/мл)	6	2,648±1,827	4,253±2,006 p=0,014	2,74±0,883	3,54±1,25 p=0,038
Лептин + Грелин (35 нг/мл + 0,87 нг/мл)	6	1,69±0,54	2,868±0,692 p=0,002	2,82±1,11	2,741±0,682

Примечание.* $p < 0.05$ по парному *t*-критерию Стьюдента по отношению к контролю

ки цитокинов Т-лимфоцитами проводили методом проточной цитометрии с использованием соответствующих моноклональных антител (eBioscience) к поверхностным (CD4, CD8) и внутриклеточным молекулам (INF-γ, IL-4) согласно методике производителя.

Результаты и обсуждение

Установлено, что грелин вне зависимости от концентрации не влиял на процессы трансляции INF-γ, но усиливал их в отношении IL-4 как Т-хелперами ($CD4^+$- Т-лимфоцитами), так и цитотоксическими $CD8^+$-Т-лимфоцитами. Лептин в исследуемых дозах не влиял на синтез INF-γ и IL-4 Т-лимфоцитами. При совместном внесении гормонов выявлялся только стимулирующий эффект грелина в отношении синтеза IL-4 $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитами, что говорит об отсутствии синергистического или антагонистического влияния со стороны лептина (таблица). Таким образом, лептин и грелин, которые являются разнонаправленными регуляторами энергетического обмена и оказывают оппозитные эффекты на направленность иммунных реакций, в концентрациях, характерных для беременности, выступают факторами, способствующими смещению иммунных реакций по Th2-типу. Помимо этого, грелин, усиливая выработку IL-4, способствует снижению цитотоксического потенциала $CD8^+$-Т-лимфоцитов, что важно для поддержания состояния иммунологической толерантности при беременности.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-01109-а

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tena-Sempere M.* Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function // Neuroendocrinology. – 2007. – V. 86. – P. 229–241.

2. *Ширшев С.В.* Иммунология материнско-фетальных взаимодействий: монография. – Екатеринбург: УрО РАН, 2009. – 582 с.

3. *Hardie L., Trayhurn P.* Circulating leptin in women: longitudinal study in menstrual cycle and during pregnancy // Clin. Endocrinol. – 1997. – V. 47. – P. 101–106.

4. *Fuglsang J., Skjжrbжk C., Espelund U., Frystyk J.* Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy // Clin. Endocrinol. – 2005. – V.62. – P. 554–559.

Orlova E.G.

LEPTIN AND GHRELIN INFLUENCE ON INF-γ AND IL-4 SYNTHESIS IN T-LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD *IN VITRO*

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Science, Ural Branch, Perm, Russia,

orlova_katy@mail.ru

Summary. The effects of leptin and ghrelin and also their combinations at doses characteristic for different trimesters of pregnancy on the intracellular synthesis of INF-γ and IL-4 in T-lymphocytes of peripheral blood are investigated *in vitro*. It is shown that ghrelin has no influence on translation of INF-γ, but stimulates intracellular synthesis of IL-4 in $CD4^+$- and $CD8^+$-T-lymphocytes. Leptin in investigated doses is not influenced on the intracellular synthesis of INF-γ and IL-4 in T-lymphocytes. At the simultaneous introduction of leptin and ghrelin the stimulating effect of ghrelin on production of IL-4 in $CD4^+$- and $CD8^+$-T-lymphocytes is revealed, but the synergism and antagonism with leptin influence is not shown. Thus, ghrelin in concentration characteristic for pregnancy increase the translation of IL-4 in $CD4^+$- and $CD8^+$-T-lymphocytes of peripheral blood.

Key words: leptin, ghrelin, T-lymphocytes, INF-γ, IL-4.

УДК 616.381-002-02:616.45-001.1/3+616.155.3-097

Плеханова Е.В., Цейликман В.Э., Синицкий А.И., Козочкин Д.А., Попов С.В.

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛОВ И КОЛИЧЕСТВА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК У КРЫС ПРИ СТРЕССЕ И ЕГО СОЧЕТАНИИ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Челябинск, Россия, kanc@chelsma.ru

Резюме. Экспериментальный стресс характеризуется снижением функциональной активности нейтрофилов и увеличением образования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Ключевые слова: гипокинезия, перитонит, нейтрофильные ловушки.

Введение

Одним из широко распространенных стресс-факторов является гипокинезия (ГК, ограничение подвижности), которая вызывает развитие ГК стресса и сопровождается специфическими и неспецифическими изменениями в функционировании практически всех органов и систем организма, в том числе и снижением неспецифической резистентности и иммунореактивности. При экспериментальном перитоните увеличивается содержание нейтрофилов в крови и изменяется их функциональный статус. Цель данного исследования – изучить показатели функциональной активности нейтрофилов и их способность образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки в условиях гипокинетического стресса и его сочетанием с септическим перитонитом.

Материалы и методы исследования

В эксперименте участвовало 43 беспородных крысы обоего пола. Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – *cecal ligation and perforation* . Гипокинезия крысам проводилась в течение 30 сут в специальных клетках-пеналах, при этом раз в день животные выпускались из клетки. По истечении 30 дней первой группе крыс моделировали перитонит.

В ходе исследования животные были распределены по следующим группам:

1) интактные животные, n=10;

2) ложнооперированные животные, n=7;

3) животные, у которых моделировался септический перитонит, n=5;

4) животные, у которых моделировался септический перитонит в сочетании с ГК, n=13.

Изучение способности нейтрофилов к захвату частиц проводили на модели поглощения частиц латекса [1]. Исследование внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов осуществлялось при помощи НСТ-теста в двух вариантах: спонтанном (базальном) и индуцированном (стимулированном) [2]. Количество нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) определяли путём окрашивания экстрацеллюлярной ДНК акридиновым красителем [3]. Полученные результаты обрабатывались пакетом статистических программ Statistica for Windows 6.0, с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки (M±m). Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при p≤0,05. О достоверности различий показателей в сравниваемых группах судили по непараметрическим критериям Манна-Уитни, Вальда-Вольфовица.

Результаты и обсуждение

В крови у крыс при перитоните содержание нейтрофилов увеличилось в 2,5 раза и при сочетании его с ГК в 2,78 раза по сравнению с интактными животными. Важно отметить, что нейтрофилы характеризуются сниженным уровнем функциональной активности. Это проявлялось в снижении показателей как спонтанного, так и индуцированного НСТ-теста, максимально снижение показателей составило в группе животных с перитноитом в сочетании с ГК: НСТ спонт. 7,4±1,8%, НСТ спонт., усл. ед. 0,07±0,01, НСТ активир. 8,3±2,53%, НСТ активир., усл. ед. 0,097±0,036. Кроме того, при сочетании 30-суточной гипокинезии и перитонита фагоцитоз нейтрофилов, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число резко снижались в отличие от этих показателей у интактных животных и которым была моделирована только гипокинезия, и составило: фагоцитирующие клетки 14,5±2,3%, интенсивность фагоцитоза 0,255±0,067 усл. ед., фагоцитарное число1,640±0,204 усл. ед.

Кроме того, в условиях экспериментального перитонита увеличивалось количество НВЛ, результаты представлены в таблице. Таким образом, изменения фагоцитарной активности сегментоядерных лейкоцитов, выявленные у животных с экспериментальным перитонитом и гипокинетическим стрессом, а также при их сочетании, свидетельствуют о “функциональном утомлении” клеток, наступающим вслед за их активацией и являющимся признаком снижения “резервной” функциональной активности фагоцитов. Такие клетки активно вступают в реакции фагоцитоза, однако по мере увеличения времени контакта с объектом фагоцитоза проявляются признаки их функциональной неполноценности, связанные как с быстрым наступлением периода “покоя”, так и со снижением их биоцидного потенциала. При этом выполнение антибактериальной защиты организма нейтрофилами поддерживается за счет образования этими клетками НВЛ.

Таблица.

Показатели содержания НВЛ у крыс в крови, %

Опыт	Номер группы	Стат. показатель	НВЛ	Не диф. клетки	Сегмент. нейтрофилы
ГК30+перитонит n=13	1	M±m	21,53±2,4	25,07±3,91	53,38±5,62
перитонит n=5	2	M±m	23,00±8,66	32,0±4,61	44,00±4,61
		p	p_{1-2}=0,003	p_{1-2}=0,003	p_{1-2}=0,003
ЛО n=7	3	M±m	19,57±0,92	27,0±4,59	53,42±3,72
		p	p_{1-3}=0,0003 p_{2-3}=0,03	p_{1-3}=0,037	p_{1-3}=0,0003

ЛИТЕРАТУРА

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптационных реакций организма. – Челябинск, 2000. – 167 с.

2. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов // М.: Издательство РАМН, 2009. – С. 208.

3. Маянский А.Н., Виксман М.К. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетрозолия : метод. рекомендации. – Казань, 1979. – 11 с.

Plekhanova E.V., Tseilikman V.E., Sinitsky A.I., Kozochkin D.A., Popov S.V.

CHANGE IN THE FUNCTIONAL NEUTROPHIL STATUS AND NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS NUMBER IN RATS UNDER STRESS AND ITS COMBINATION WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia, kanc@chelsma.ru

Summary. Functional activity of neutrophils was reduced and neutrophil extracellular trap formation was increased under an experimental stress.

Key words: hypokinesia, peritonitis, neutrophil extracellular traps.

УДК 616-097

Раев М.Б.[1], Бочкова М.С.[1], Тимганова В.П.[1], Храмцов П.В.[2], Тюленев А.В.[2]

КОНСТРУИРОВАНИЕ СИСТЕМ ОЦЕНКИ УРОВНЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ В СЫВОРОТКЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, mraev@iegm.ru; krasnykh-m@mail.ru; timlera@rambler.ru; [2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия, zzzzzzz77777@uandex.ru; leksey333@yandex.ru

Резюме. Сконструированы модельные тест-системы в двух вариантах на основе неферментных углеродных диагностикумов для определения уровня альфа-фетопротеина в сыворотке беременных женщин полуколичественным методом. Полученные системы обладают рядом привлекательных качеств: высокой специфичностью и чувствительностью, экспрессностью, простотой в использовании, аппаратной независимостью. Особое значение имеет чрезвычайная стабильность при хранении.

Ключевые слова: неинструментальная тест-система; конъюгат на основе наноразмерных углеродных частиц; альфа-фетопротеин.

Введение

Альфа-фетопротеин (АФП) – онко-фетальный белок, вырабатывающийся у человека в период беременности, а также при некоторых онкологических заболеваниях. В настоящее время содержание АФП в периферической крови беременных женщин является важнейшим диагностическим показателем состояния плода. При скрининге имеет диагностическое значение как увеличение, так и снижение уровня АФП, что свидетельствует об актуальности решения проблемы его оперативного количественного определения в период гестации [1, 2, 3]. Это затруднительно при использовании стандартных инструментальных методов анализа. В связи с этим клиническая практика требует наличия более простых и быстрых методов измерения концентрации АФП. В качестве таких методов может быть использован способ анализа, позволяющий проводить полуколичественное определение АФП в сыворотке крови беременных женщин. В современной диагностической практике не существует широко распространенных тест-систем для определения АФП в сыворотке крови в варианте

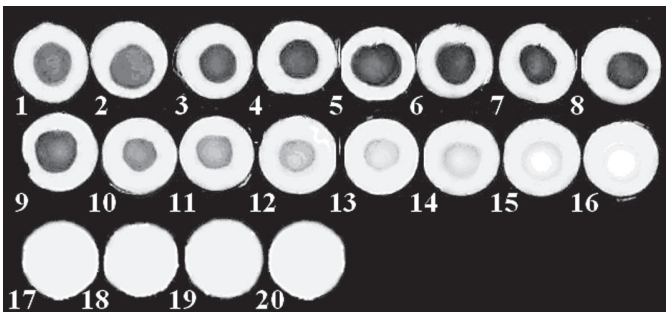


Рис. 1. “Сэндвич” модель определения АФП с использованием конъюгата углерод – моноклональные антитела к АФП.
1-17 – последовательная раститровка АФП с 0,05 мг/мл до 0,75 нг/ мл. 18-20 –отрицательные контроли.

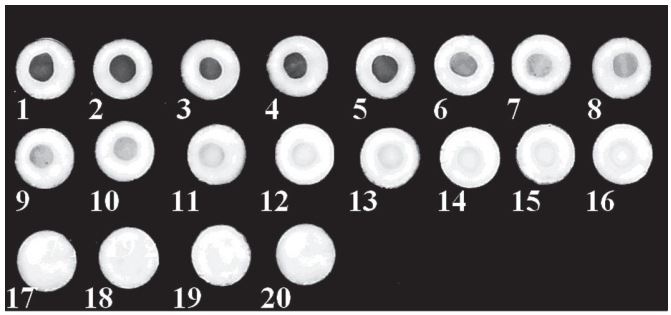


Рис. 2. “Сэндвич” модель определения АФП с использованием биотинилированных антител к АФП и стрептавидиновым конъюгатом.
1-17 – последовательная раститровка АФП с 0,05 мг/мл до 0,75 нг/ мл. 18-20 – отриотрицательные контроли.

упрощенного неинструментального анализа. Разработка таких тест-систем позволила бы значительно сократить время, затрачиваемое на проведение анализа, по сравнению с классическим вариантом используемого инструментального метода (стандартный иммуноферментный анализ).

Цель настоящей работы – создание модельных тест-систем на основе углеродных частиц для полуколичественного анализа содержания АФП в сыворотке крови беременных женщин.

Материалы и методы исследования

Предлагаемый метод представляет собой вариант дот-блот анализа в формате “сэндвич” аранжировки. Анализ проводили в двух вариантах. В качестве основы твёрдофазного реагента использовали диски из нитроцеллюлозной мембраны диаметром 5 мм с размером пор 0,45 мкм (“Bio-Rad”, США), на которые наносили моноклональные антитела к АФП дотами из капель по 5 мкл в концентрации 0,05 мг/мл в забуференном фосфатами физиологическом растворе с азидом натрия. Для оценки специфичности тест-ситемы в качестве внутреннего отрицательного контроля сорбировали бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрации 0,1 мг/мл. После подсушивания мембраны и 60-ти минутной инкубации в блокирующем растворе, в качестве которого использовали забуференный фосфатами физиологический раствор, содержащий 0,05% Твина-20 и 1% казеина, мембраны помещали в лунки планшета, заполненные забуференным фосфатами физиологическим раствором, содержащим АФП в серийном разведении, кратном двум, начиная с концентрации 0,05 мг/мл. Длина серии разведений составляла 16 точек. В качестве внешнего отрицательного контроля мембрану с нанесенными антителами к АФП помещали в лунку с забуференным фосфатами физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твина-20 (ЗФРТ). Время инкубации составляло 30 минут, после чего мембраны промывали ЗФРТ и в первом варианте осуществляли детекцию конъюгатом углерод-моноклональные антитела к АФП в течение 15 минут. Во втором случае мембраны инкубировали с биотинилированными моноклональными антителами к АФП (30 минут) и детектировали систему конъюгатом углерод-стептавидин. Для получения неферментных диагностикумов моноклональные антитела к АФП и стрептавидин ковалентно конъюгировали с частицами углерода по оригинальной авторской методике [4, 5]. Моноклональные антитела, используемые для твердофазного реагента, и в качестве аффинного соединения диагностикума не имели перекрестного взаимодействия с соответствующими антигенными детерминантами белка (по данным производителя). Оценку результатов проводили визуально по черному окрашиванию зоны специфического связывания углеродного диагностикума.

Результаты и обсуждение

Установлено, что чувствительность предлагаемой тест-системы в “сэндвич” варианте дот-блотинга на нитроцеллюлозной мембране с использованием конъюгата углерод-моноклональные антитела к АФП (рис.1) и стрептавидинового конъюгата (рис. 2) позволяет выявлять уровень АФП в концентрации менее 1,5 нг/мл. Для оценки специфичности сконструированной системы использовали данные как внутренних, так и внешних отрицательных контролей. О высокой специфичности данной тест-системы свидетельствуют результаты экспериментов, согласно которым не обнаружено перекрестной реакции с сывороточным белком, о чем свидетельствует отсутствие окрашивания в зонах его сорбции на твердой фазе.

Полученные результаты показали, что разработанные методы анализа обладают высокой чувствительностью и специфичностью, позволяют качественно и полуколичественно детектировать уровень АФП, дают возможность существенно сократить время анализа и пригодны для использования в качестве экспресс-метода в режиме скрининговых исследований.

Работа выполняется при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Решетников С.С.* Иммуноферментный анализ альфафетопротеина, использование в диагностике заболеваний человека // В кн.: Диагностическая значимость выявления маркеров фетоплацентарного комплекса в контроле развития беременности. – Кольцово, 2009. – С. 11–13.

2. Brock D.J. Alphafetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida // The Lancet. – 1972. – V. 300. – P. 197–199.

3. *Brock D.J.* Impact of maternal serum alpha-fetoprotein screening on antenatal diagnosis // British Medical Journal. – 1982. – V. 285. – P.365–367.

4. *Плаксин Д.Ю., Раев М.Б., Громаковская Е.Т.* Способ стереоспецифического анализа и способ получения конъюгата для стереоспецифического анализа // Патент на изобретение РФ 20899212 от 10.09.1997.

5. *Rayev M., Shmagel K.* Carbon-protein covalent conjugates in non-instrumental immunodiagnostic systems // J. Immunological Methods. – 2008. – V. 336. № 1. – P. 9–15.

Rayev M.B.[1], Bochkova M.S.[1], Timganova V.P.[1], Khramtsov P.V.[2], Tyulenev A.V.[2]

DESIGNING OF CARBON PARTICLE-BASED SYSTEMS FOR ALPHA-FETOPROTEIN EVALUATION IN SERA OF PREGNANT WOMEN

[1] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, mraev@iegm.ru; krasnykh-m@mail.ru; timlera@rambler.ru;

[2] Perm State National Research University, Russia, zzzzzzz77777@uandex.ru; leksey333@yandex.ru

Summary. Model test-systems were designed based on non-enzyme carbon diagnosticums to determine the alpha-fetoprotein level in sera of pregnant women using a semiquantitative method. Created systems possess a number of attractive properties, such as high specificity and sensitivity, promptness, ease of use, independence from instrumentation. Of particular value, appears to be high storage stability.

Key words: non-instrumental test-system, nanosized carbon particle-based conjugate, alpha-fetoprotein.

УДК 571.27

Сайдакова Е.В., Шмагель К.В.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИМУСА ЖЕНЩИН ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН,

г. Пермь, Россия, radimira@list.ru, shmagel@iegm.ru

Резюме. Несмотря на значительную инволюцию, во время беременности тимус находится в функционально активном состоянии. Опираясь на данные, полученные с использованием αTREC в качестве молекулярного маркера недавних эмигрантов из тимуса, мы предполагаем, что уменьшение массы вилочковой железы в большей мере связано с усиленной эмиграцией клеток на периферию, нежели со снижением продуктивной функции органа.

Ключевые слова: продуктивная функция тимуса, беременность, αTREC.

Введение

Во время физиологической беременности наблюдается значительное снижение массы тимуса [1]. Морфологически это проявляется сокращением размеров кортикальной части вилочковой железы. Несмотря на выраженную инволюцию, во время гестации тимус находится в функционально активном состоянии. Одним из методов исследования изменений продуктивной функции вилочковой железы во время беременности является анализ количества побочных продуктов реарранжировки сегментов генов Т-клеточного рецептора (ТкР). Гены, кодирующие цепи ТкР, существуют только в Т-лимфоцитах. Они образуются во время внутритимической дифференцировки путем рекомбинации пространственно разобщенных генетических сегментов. Суть рекомбинации сводится к "вырезанию" участка ДНК между удаленными сегментами, что приводит к их сближению и формированию гена, кодирующего белковую цепь рецептора. Вырезанные фрагменты замыкаются в кольца и остаются в клетке в виде внехромосомных образований, получивших название TREC (T cell Receptor Excision Circles). В отличие от остальной ДНК, эти кольца не удваиваются во время митоза, а, следовательно, постепенно разбавляются по мере клеточного деления. Благодаря этому TREC можно считать свидетелями прошедшей реарранжировки гена ТкР. Из четырех генов рецепторных цепей последним формируется ген α-цепи. Поэтому разбавление αTREC при делении тимоцитов оказывается минимальным. Таким образом, определяя количество TREC α-цепи в периферических Т-лимфоцитах, можно примерно оценить темпы выхода наивных Т-клеток из вилочковой железы, и составить представление о продуктивной функции этого органа [2]. Цель настоящей работы – исследование функциональной активности тимуса женщин на разных сроках беременности.

Материалы и методы исследования

Материал для исследований. Периферическая венозная кровь женщин. Выделение ДНК проводили из 0,5 мл цельной крови с использованием набора реагентов "KR-012" фирмы "OMNIX" (Россия) согласно инструкции производителя.

ПЦР в реальном времени. В качестве референса использована геномная последовательность β-актина (набор 401846, "Applied Biosystems", США). В пробирки, содержащие готовую реакционную смесь (M-437-200, "Синтол", Россия), вносили по 0,5 мкл прямого (5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT) и обратного (3'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG) праймеров (10 пкмоль/мкл) к последовательностям αTREC или β-актин, по 0,5 мкл (10 пкмоль/мкл) флуоресцентных зондов, соответственно, "αTREC зонд" (FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT-BHQ1) или "β-актин зонд" (набор 401846) и по 5 мкл раствора исследуемого образца. Общий объем реакционной смеси – 25,0 мкл – достигался добавлением деионизированной воды. Реакцию осуществляли по программе: 95°C – 180 сек, 1 цикл; 61°C – 20 сек, 70°C – 10 сек, 95°C – 15 сек, 50 циклов.

Математический анализ проведен методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Достоверность различий между группами оценивалась на основе *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Инволюция тимуса во время беременности описана в 40-х годах XX в. Однако мнения о функциональной активности органа в этот период разделились. МакЛин с соавт. [1] выдвинули предположение о том, что на поздних этапах беременности тимус сохраняет свою активность, а снижение массы железы вызвано усиленным оттоком клеток к периферическим органам. Другие авторы, напротив, сообщают о снижении продуктивной функции тимуса, призванном предотвратить отторжение полуаллогенного плода [3].

Данные, полученные при использовании αTREC в качестве молекулярного маркера продуктивной функции тимуса, показали, что их количество в периферической крови беременных женщин в любом из триместров не имеет статистически достоверных отличий ($p>0,05$) от исследуемого показателя контрольной группы небеременных женщин (таблица). Примечательно, что, несмотря на значительное снижение массы вилочковой железы, наблюдаемой во время физиологического развития беременности, не происходит ярко выраженных изменений продуктивной функции тимуса.

Выводы

Таким образом, исследование количества αTREC в клетках периферической крови женщин позволило установить, что тимус сохраняет функциональную активность на протяжении всего срока беременности.

Работа выполнена при поддержке гранта Научных и инновационных проектов молодых ученых и аспирантов Уральского отделения РАН 2011 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mclean J.M., Mosley J.G., Gibbs A.C.C.* Changes in the thymus, spleen and lymph nodes during pregnancy and lactation in the rat // J. Anat. – 1974. – V. 118(2). – P.223–229.

2. *Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection // Nature. – 1998. – V. 396. – P.690–695.

3. *Taub D.D., Longo D.L., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Koup R.A.* Insights into thymic aging and regeneration // Immunological Rev. – 2005. – V. 205. – P.72–93.

Таблица.

Изменение количества молекул αTREC в лимфоцитах периферической крови в течение физиологического развития беременности

Показатели	Группы обследованных женщин			
	Небеременные женщины n = 12	Беременные женщины		
		I триместр n = 16	II триместр n = 13	III триместр n = 12
	0	1	2	3
Возраст (лет)				
Медиана Процентили (25-75)	27 (20-33)	26 (23-28)	29 (27-33)	28 (25-33)
Кол-во αTREC (о.е.)				
абсолютные значения*	0,86	0,8	0,86	0,7
их границы (±1σ)	0,68ч1,08	0,61ч1,02	0,67ч1,09	0,53ч0,94
$\log_{10}$ (M ± m)	-0,1539±0,0674	-0,2294±0,063	-0,1577±0,0683	-0,3553±0,0833
		$P_{0-1}>0,05$	$P_{0-2}>0,05$	$P_{0-3}>0,05$

Примечание. 0, 1, 2, 3 – группы сравнения (нумерация в оглавлении таблицы). *– приведены средние геометрические величины.

Saydakova E.V., Shmagel K.V.

THYMIC FUNCTIONAL ACTIVITY DURING PREGNANCY

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms RAS, Perm, Russia, radimira@list.ru, smagel@iegm.ru

Summary. The central role of thymus in the development of immunological competence is firmly established. While thymic weight falls during pregnancy we ascertain that its functional activity remains unchanged. As αTREC numbers show no recessionary tendencies in peripheral blood mononuclear cells, we presume that thymic involution is related to an increased outflow of cells to the peripheral lymphoid organs.

Key words: thymic productive function, pregnancy, αTREC.

УДК: 616.831-097

Светлакова В.А., Давыдова Е.В.

МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Челябинск, Россия, valent4s@yandex.ru

Резюме. В работе определены уровни молекулярных маркеров повреждения ткани головного мозга (нейронспецифическая енолаза, мозговой натрийуретический пептид и белок S-100) у больных с ранними формами хронической цереброваскулярной патологии. Установлены максимальные уровни нейроспецифических маркеров в сыворотке крови пациентов с диагнозом дисциркуляторная энцефалопатия 1 степени, которые существенно превышали аналогичные показатели у больных с начальными проявлениями нарушений кровоснабжения мозга и здоровых лиц, что может являться биохимическим маркером микроорганического поражения ткани мозга при ДЭП I степени.

Ключевые слова: хроническая цереброваскулярная патология, нейроспецифические маркеры.

Введение

Начальные проявления нарушений кровоснабжения мозга (НПНКМ) являются самой ранней формой хронических цереброваскулярных заболеваний (ХЦВЗ), при которой имеются функциональные нарушения и отсутствует микроочаговая неврологическая симптоматика. При дисциркуляторной энцефалопатии 1 стадии (ДЭП-1) имеют место структурные микропоражения ткани мозга, что клинически проявляется неврологическими микроочаговыми симптомами. В настоящее время для верификации поражения нейронов головного мозга на ранних стадиях инсульта применяется определение ряда молекулярных маркеров (нейронспецифическая енолаза, белок S-100, мозговой натрийуретический пептид), уровень которых коррелирует с выраженностью повреждения тканей головного мозга при данном заболевании [1, 2, 3].

Целью настоящего исследования является определение уровней молекулярных биохимических маркеров повреждения ткани головного мозга у больных с диагнозом НПНКМ и ДЭП-1, а также сывороточного лактоферрина, обладающего свойствами алармина.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач было обследовано 88 мужчин в возрасте от 30 до 50 лет, разделенных на три группы. В 1 группу включены 38 человек (45,0 ± 2,4 лет) с НПНКМ, во 2 группу – 34 пациента (47,0 ± 1,7 лет) с ДЭП-1 и в 3 группу – 16 практически здоровых лиц (средний возраст 39,0 ± 1,7 лет).

Диагноз НПНКМ и ДЭП-1 ставился в соответствии с отечественной классификацией сосудистых поражений головного и спинного мозга Е.В. Шмидта (1985) на основе клинико-неврологических критериев и данных инструментального обследования.

Методы исследования включали иммуноферментный метод определения в крови пациентов уровней нейронспецифических маркеров и аларминов в сыворотке крови пациентов. Результаты реакции учитывались на планшетном фотометре «Multiscan plus» (Labsystems, Финляндия).

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программ “Statistica for Windows 6.0”. Данные в таблицах представлены в виде универсальной средней – медианы (Me) и квартильного размаха (Q_{25} - Q_{75}).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования уровня нейронспецифических маркеров и аларминов представлены в таблице.

Как следует из таблицы, уровни нейронспецифической енолазы (НСЕ), мозгового натрийуретического пептида (BNP) и белка S-100 достоверно не различаются у пациентов с диагнозом НПНКМ и контрольной группой. Уровни данных маркеров у больных с ДЭП-1 оказались достоверно более высокими в сравнении с пациентами, имеющими начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга, и контрольной группой. Уровень лактоферрина у пациентов с диагнозом ДЭП-1 и больных с НПНКМ не различался между группами, однако имел статистически значимые различия с контрольной группой. Таким образом, повышение в системном кровотоке уровней нейроспецифических белков (НСЕ, BNP и белка S-100) у пациентов с ДЭП I степени может служить биохимическим маркером микроструктурных изменений тканей головного мозга и критерием дифференциальной диагностики между НПНКМ и ДЭП-1. Алармины - молекулы тревоги позволяют уточнить наличие эндогенных сигналов повреждения клеток, возникающих на ранних стадиях ХЦВЗ.

Заключение

Таким образом, исследование уровней нейроспецифических белков в крови обследуемых в качестве маркеров повреждения ткани мозга у больных с ранними формами хронической цереброваскулярной патологии наряду с методами нейровизуализации является одним из перспективных направлений ангионеврологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cakir Z., Saritas A., Emet M., Aslan S., Akoz A., Gundogdu F. A prospective study of brain natriuretic peptide levels in three subgroups: Stroke with hypertension, stroke without hypertension, and hypertension alone // Original Article. – 2010. – V. 13. – P. 47–51.

2. Chamorro A., Amaro S., Vargas M., Obach V., Cervera A., Gymez-Choco M., Torres F., Planas AM. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke // Journal of the Neurological Sciences. – 2007. – V. 252. – P. 29– 35.

3. Qiu J., Nishimura M., Wang Y., Sims J.R., Qiu S., Savitz S.I., Salomone S., Moskowitz M.A. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2008. – V. 28. – P. 927–938.

Таблица.

Уровень нейроспецифических маркеров и аларминов при ранних формах ХЦВЗ

Показатель	НПНКМ (1 группа)		ДЭП-1 (2 группа)		Контроль (3 группа)		P< 0,05
	Me	$Q_{(25–75)}$	Me	$Q_{(25–75)}$	Me	$Q_{(25–75)}$	
Нейроспе-цифическая енолаза, μ/L	12,38	10,75–17,23	15,70	11,75–29,65	11,95	9,90–18,17	1–2 2–3
Мозговой натрий-уретический пептид, fmol/ml	4,21	2,82–6,26	8,539	4,302–11,05	3,483	1,75–7,67	1–2 2–3
Белок S-100, нг/л	80,71	69,05–94,76	89,36	79,05–106,90	76,03	64,36–89,05	1–2 2–3
Лактоферрин, нг/мл	1003,00	793,60–1974,00	1307,00	1006,00–1787,00	499,80	425,60–887,20	1–3 2–3

Svetlakova V.A., Davidova E.V.

MARKERS OF NERVE TISSUE INJURY IN THE EARLY FORMS OF CHRONIC CEREBROVASCULAR DISEASES

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia,
valemt4s@yandex.ru

Summary. The present study determined the levels of molecular markers of brain damage (neuronspecific enolase, brain natriuretic peptide and protein S-100) in patients with early forms of chronic cerebrovascular pathology.

Maximum levels of neuronspecific markers were found in the serum of patients with a diagnosis of discirculatory encephalopathy 1 stage. That substantially exceed those levels in patients with an earlier form of chronic cerebrovascular disease – initial manifestations of circulatory disorders of the brain.

Key words: chronic cerebrovascular pathology, lactoferrin, neuronspecific markers.

УДК 616.216-002-085.1-097

Семенов М.В.

СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И РЕГУЛЯТОРНЫХ Т- КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ НАЗАЛЬНЫМИ КОРТИКОСТЕРОИДАМИ И ФУРОСЕМИДОМ

Учреждение Российской академии наук Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия, iip@iip.uran.ru

Резюме. Обследовано 17 больных ПР, получающих противорецидивное лечение интраназальными инстилляциями фуросемида в течение 6 месяцев ежедневного применения препаратов и мометазона фуроата. Было продемонстрировано снижение эозинофилии периферической крови на фоне терапии и восстановление уровня регуляторных Т-клеток, определяемых методом проточной цитометрии по CD4+,CD25+,CD127– мембранным рецепторам лимфоцитов до уровня группы сравнения. Не было показано никаких отрицательных влияний такой терапии на показатели системного иммунитета.

Ключевые слова: Полипозный риносинусит, проточная цитометрия, Т-регуляторные клетки, топические глюкокортикостероиды, фуросемид.

Введение

Полипозный риносинусит (ПР) – хроническое гиперпластическое воспаление слизистой оболочки носа и придаточных пазух. Существует ряд этиопатогенетических теорий развития полипов в носу, всех их объединяет общий момент – гиперэргическая реакция на антигенную стимуляцию. При этом вопрос количественных и качественных показателей механизмов аутотолерантности остается неизученным. Большое количество теорий развития ПР обуславливает и разные подходы к противорецидивной терапии [1, 4, 5, 6].

В последнее время внимание медицинской общественности привлечено к интраназальным инстилляциям фуросемида как ингибитора Na-K насоса [5]. При этом влияние данного лечения на показатели иммунного статуса не изучено.

Целью данного исследования было определение изменений показателей клеточного и гуморального иммунного ответа на фоне терапии интраназальными инстилляциями фуросемида в составе комплексной терапии.

Материалы и методы исследования

Группу исследования составили 17 больных ПР, получивших хирургическое лечение по показаниям в отделении оториноларингологии Челябинской областной клинической больницы и инстилляции фуросемида, и 18 больных ПР, получавших мометазона фуроат в дозировке 400 мкг/сут, интраназально. В группе сравнения наблюдались 37 больных ПР до начала лечения. С целью исключения неспецефического влияния на показатели нарушений носового дыхания в качестве контроля была определена группа 19 человек с невоспалительными заболеваниями носа, сопровождающимися затруднением носового дыхания.

Всем пациентам опытной группы произведена типичная эндоскопическая операция полости носа и придаточных пазух по клиническим показаниям.

Спустя 2-3 недели, по мере заживления операционной раневой поверхности, назначалась медикаментозная противорецидивная терапия интраназальными инстилляциями фуросемида ежедневно в количестве 500 мкг 2 раза в день в каждую половину носа на протяжении 6 месяцев. После лечения производился забор крови на иммунограмму с определением субпопуляций Т-лимфоцитов типированных по CD4,CD25,CD127, клеточным рецепторам. Т-регуляторные клетки определяли как лимфоциты, имеющие CD4+, CD25+, CD127– рецепторный профиль.

Определение субпопуляций иммунных клеток производилось методом проточной цитометрии на проточном цитометре FC500 фирмы “Backman Coulter” США [2,3].

Результаты и обсуждения

Нами были получены следующие изменения: снижение эозинофилии периферической крови до уровня 3,12% против 5,59% до лечения и 2,83% у группы контроля. Также отмечено увеличение Т-регуляторных клеток и их восстановление до значений группы контроля 7,08% против 2,46% у группы сравнения и 7,39% у пациентов без ПР. Аналогичная картина была получена при исследовании влияния топических стероидов. Так же было выявлено снижение количества эозинофилов до 2,75% и увеличение количества регуляторных Т-клеток до нормы 7,62%.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что интраназальная терапия фуросемидом и кортикостероидами практически идентично изменяет показатели системного иммунитета, которые могут быть связаны либо с прямым иммуномодулирующим действием препарата, либо с неспецифической реакцией механизмов воспаления на снижение местной воспалительной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Плужников М.С., Муминов А.И.* Полипозные риносинуситы. – Санкт-Петербург, 1999. – 178 с.

2. *Хайдуков С.В., Зурочка А.В.* Вопросы современной проточной цитометрии: клиническое применение. – Челябинск: ЧелГМА, 2008. – 195 с.

3. *Хайдуков С.В., Зурочка А.В.* Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg,Th17,Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13. – № 1. С.7–16.

4. *Bachert C., Wagenmann M., Hauser U., Rudack C.* IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue // J. Allergy Clin. Immunol.– 1997. – N. 99. – P.837–842.

5. *Bellussi L., Marchi G., Lauriello M., Passali D.* Longitudinal study on nasal polyposis: etiopathogenetic,clinical and therapeutic aspects // Acta Otorhinolaryngol. Ital. – 1996. – V. 16. N. 2. – P.109–113.

6. *Gosepath J., Brieger J., Gletsou E., Mann W.J.* Expression and localization of cyclooxygenases (Cox-1 and Cox-2) in nasal respiratory mucosa. Does Cox-2 play a key role in the immunologyof nasal polyps // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2004. – V. 14. N. 2. – P. 114–128.

Semenov M.V.

CONDITION OF IMMUNE SYSTEM AND REGULATORY T – CELLS AT PATIENTS WITH POLYPOSIS RINISINUSITES BEFORE TREATMENT NASALS CORTICOSTEROIDS AND FUROSEMIDES

Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia,
iip@iip.uran.ru

Summary. It is surveyed 17 patients with polyposis rinosinusitis receiving antirecedividial treatment intranasal instillations of furasemides within 6 months of daily application of preparations and mometazon fuorat. Decrease of eosinophilie has been shown peripheral blood against therapy and level restoration регуляторных the T-cells defined by a method flowing cytometry on CD4 +, CD25 +, CD127 - to membranosis receptors of lymphocytes to level of group of comparison. It has not been shown any negative influences of such therapy on indicators of system immunity.

Key words: polyposis rinosinusitis, flowing cytometry, the regulatory T - cells, topical glucocorticosteroides, furosemide

УДК 618.1-073.43-097

Семёнова И.В.[1], Гизингер О.А.[1], Зиганшин О.З.[2], Зиганшина Т.А.[2], Семёнов Ю.А.[3]

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНОГО КАНДИДОЗА

[1]Научно-исследовательский институт иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия”, г. Челябинск, OGizinger@gmail.com;

[2]Областной кожно-венерологический диспансер, г. Челябинск; [3]Областной перинатальный центр; г. Челябинск

Резюме: Проведено рандомизированное клиническое иммунологическое исследование 65 женщин репродуктивного возраста с хроническим рецидивирующим вульвовагинальным кандидозом. Выявленный воспалительный процесс нижнего отдела репродуктивного тракта и связанные с ним дисфункции факторов местного иммунитета были успешно устранены с помощью ультразвуковых воздействий низкой интенсивности.

Ключевые слова: вульвовагинальный кандидоз, ультразвук низкой интенсивности, иммунные дисфункции.

Введение

По данным ВОЗ этиологическим агентом, вызывающим хронические воспалительные заболевания урогенитального тракта женщин в 27-30% случаев являются грибы рода *Candida*. Поскольку патогенез рецидивирующего течения кандидоза гениталий окончательно не изучен и остаётся поводом для дискуссий, то повышение эффективности терапии воспалительных заболеваний органов малого таза, вызванных данным возбудителем, является весьма актуальной задачей. Особую актуальность проблеме придаёт наблюдаемый в последнее десятилетие её стабильно-устойчивый рост, характеризующийся торпидным течением, частыми рецидивами и значительным количеством осложнений [1, 2]. Исследования, проведённые за последнее десятилетие, показали, что ультразвук низкой интенсивности оказывает неспецифическое воздействие на факторы колонизационной резистентности репродуктивного тракта. Эффекты ультразвуковых воздействий обусловлены тем, что струйное орошение ультраозвученным раствором позволяет использовать сочетанное воздействие мелкодисперстным раствором антисептика с одновременной низкочастотной ультразвуковой кавитацией, которая сама оказывает антисептический (бактерицидный или бактериостатический эффект). Вышеперечисленные обстоятельства делают оправданным применение данного метода в комплексной терапии воспалительных заболеваний нижнего отдела репродуктивного тракта, в том числе и вульвовагинального кандидоза [5].

Цель исследования – изучение особенностей течения кандидозной инфекции урогенитального тракта и анализ факторов местной противоинфекционной защиты до и после терапии с применением ультразвука низкой частоты.

Материалы и методы исследования

На базе ГУЗ “Областной Кожно-венерологический диспансер” было проведено рандомизированное клинико-иммунологическое исследование 105 женщин репродуктивного возраста, разделенных на группы: 50 женщинам было проведено базисное лечение с применением антимикотических препаратов (флюканозол 150 мг трижды с интервалом 72 часа перрорально); 55 пациенткам в комплекс лечебных мероприятий был введён ультразвук низкой интенсивности, генерируемый аппаратом Кавитар (свидетельство на полезную модель № 14515 от 10.08.2000). Параметры воздействия: частота колебаний 29 кГц, амлитуда колебаний 25 мкм. Курс лечения - 10 ежедневных процедур. План исследования соответствовал положениям Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра. Учёт результатов культурального исследования на наличие грибов рода *Candida* проводился на бак. анализаторе IEMS с использованием тест-систем Auxacolor-2. Диагностическим считался титр 10^3 КОЕ/мл и выше. Пациентки проходили обследование, включавшее осмотр венеролога, микроскопическое исследование отделяемого цервикального канала, цитологическое исследование, оценку показателей местного иммунитета с оценкой цитокинового профиля. При обследовании мочеполовых органов оценивалось состояние слизистой оболочки и кожи преддверия влагалища, наружного отверстия уретры, перианальной области, обращалось внимание на наличие свободных выделений, их цвет, характер, а также оценивалось состояние слизистой оболочки влагалища и шейки матки. Для оценки иммунологической эффективности применения физиотерапевтических воздействий был проведён сравнительный анализ динамики факторов местной противоинфекционной защиты женщин с урогенитальным микоплазмозом. Материалом для исследования служила цервикальная слизь, в которой были исследованы качественный и количественный состав лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание жизнеспособных клеток в 1 л секрета, функциональная активность нейтрофилов. Цифровой материал обрабатывался с помощью пакета прикладных программ “Statistica for Windows”

Результаты и обсуждение

Выяснено, что клинически остро процесс протекал у 15% от общего числа обследованных. В 85% преобладало подострое, торпидное течение заболевания. Пациенток беспокоили: зуд половых органов, рези при мочеиспускании. Слизистая оболочка была умеренно гиперемирована с застойно-синюшным оттенком. Уретрит отмечен у 68,74%. У больных отмечалась умеренная пастозность стенки уретры, при массаже отмечалось небольшое количество отделяемого. Анализ выделений показал наличие патологических выделений у всех женщин; их количество было умеренным, чаще они имели желтый цвет, были гомогенные. После окончания терапии с использованием ультразвука низкой интенсивности жалобы предъявляли лишь 2,8% пациенток по сравнению с группой получавших базисное лечение, где эта жалоба встречалась в 12,7%. Через 1 месяц после окончания лечения более высокий процент положительных результатов (по результатам бактериологического исследования) зарегистрирован у больных, леченых по базисной схеме по сравнению с контрольными результатами женщин, получавших комплексную терапию. Положительная динамика эрадикации *Candida albicans* в группе больных, получивших терапию с использованием ультразвука, показала целесообразность его включения в схему комплексного лечения. В группе больных, в комплекс лечебных мероприятий которых был включён низкочастотный ультразвук, клиническое выздоровление, эрадикация патогена и нормализация локального иммунного статуса наступила в 95,11% случаев, тогда как у пациенток, пролеченных по базисной схеме, клиническое выздоровление наступило в 80,24% случаев. Данные клинико-иммунологического наблюдения свидетельствуют о совпадении клинического улучшения течения заболевания с нормализацией иммунологических показателей. У больных после лечения с применением кавитационных воздействий нормализовалось общее число лейкоцитов и их фагоцитарная активность. При анализе влияния низкочастотного ультразвука на состояние системы цитокинов у обследованных было выявлено увеличение содержания ИЛ-8 и снижение концентрации ИЛ-1α, ИЛ-1β, ФНО-α. После терапии с использованием ультразвука у женщин с хроническим рецидивирующим вульвовагинальным кандидозом нормализовался и на момент проведения контрольного исследования соответствовал показателям здоровых женщин.

Выводы

1. Использование ультразвука низкой интенсивности в терапии хронического рецидивирующего вульвовагинального кандидоза повышает эффективность лечения этого заболевания и позволяет получить результат, не достижимый при использовании только одного из воздействующих лечебных факторов, применяемых в традиционных лечебных схемах.

2. Положительный иммунологический эффект использования низкочастотного ультразвука в терапии больных с кандидозной инфекцией гениталий выражается в устранении дисфункции иммунологических показателей цервикального секрета

ЛИТЕРАТУРА

1. *Анкирская А.С.* Генитальный кандидоз в структуре оппортунистических инфекций влагалища. Принципы лабораторной диагностики и значение мониторинга чувствительности грибов к антимикотикам // Акуш. и гин. – 2009. – № 5. – С. 31–37.

2. *Мирзабалаева А.К.* Диагностика и лечение кандидоза половых органов у женщин, девочек и подростков: Учебное пособие. – СПб., 2009. – 96 с.

3. *Перламутров Ю.Н.* Цитокиновый профиль пациенток с хронической кандидозно-бактериально-вирусной инфекцией генитальий // Матер. III Всер. съезда дерматовенерологов. – Казань, 2009. – 88 с.

4. *Прилепская В.Н.* Клиническая гинекология. М.: МЕДпресс-информ. – 2007. – 479 с.

5. *Торчинов А.М.* Использование низкочастотного ультразвука для лечения бактериального вагиноза и других ИППП // Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2008. – Т. 7. № 1. – С.43–46.

Semenova I.V.[1], Gizinger O.A.[1], Ziganshina T.A.[2], Ziganshin O.R.[2], Semenov Y.A.[3]

IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF LOW – FREQUENCY ULTRASONIC RADIATION AT THERAPY CHRONIC UROGENITAL CANDIDAL INFECTION

[1]Research institute of Immunology of Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia, OGizinger@gmail.com; [2]Dispensary of the skin and venereal disease, Chelyabinsk, Russia; [3] Regional Perinatal Centre, Chelyabinsk. Russia

Summary. The random clinical immunological study of 65 women in reproductive age with candida albicans infection was low-frequency ultrasonic radiation successfully eliminated revealed inflammatory process as well as dysfunctions of mucosal immunity factors connected with inflammation.

Key words: Candida albicans infection, Low-frequency ultrasonic radiation, dysfunctions of immunity factors

---

УДК 612.112.91.017.062:612.018

Смирнова Т.Г., Савочкина А.Ю., Долгушин И.И., Шишкова Ю.С.

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭСТРИОЛА

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия” Минздравсоцразвития России, г. Челябинск, Россия, www.chelsma.ru

Резюме. В статье представлены результаты исследования влияния эстриола в концентрациях, соответствующих первому, второму и третьему триместрам беременности, на формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек in vitro. Определено, что эстриол в концентрации, соответствующей второму триместру беременности, приводит к формированию внеклеточных ловушек нейтрофилами, выделенными из периферической крови.

Ключевые слова: нейтрофил, нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ), эстриол.

Введение

Известно, что стероидные гормоны обладают выраженным влиянием на иммунитет. Во время беременности, присутствуя в крови матери в значительно более высоких, чем вне беременности концентрациях, они индуцируют целый ряд изменений в иммунной системе. Среди женских половых гормонов ведущая роль во время беременности принадлежит эстриолу. Он синтезируется преимущественно плацентой из стероидных предшественников, поставляемых плодом [1]. Как свидетельствуют современные данные, на иммунных клетках обнаружены рецепторы к различным гормонам и нейромедиаторам, что определяет возможность модулирующего влияния этих агентов на функции иммунокомпетентных клеток.

Важная роль в формировании резистентности организма принадлежит нейтрофильным гранулоцитам, которые “пожирают” возбудителей и обезвреживают их с помощью специальных антимикробных белков. Согласно данным исследования, проведенного специалистами отдела клеточной микробиологии под руководством Arturo Zychlinsky, нейтофилы могут “выбрасывать” сетевидные образования, в которых задерживаются, нейтрализуются, а затем и погибают микроорганизмы. Эти новые структуры получили название нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET-Neutrophil Extracellular Traps) [2].

Целью нашего исследования являлось изучение формирования внеклеточных ловушек нейтрофилами под влиянием эстриола.

Материалы и методы исследования

Нами было обследовано 15 условно здоровых небеременных женщин в возрасте 18-35 лет в первую фазу менструального цикла. У женщин был определен эндогенный уровень эстриола методом иммуноферментного анализа для исключения из исследования женщин, чьи показатели концентрации гормона выходили за пределы нормы. Чистую фракцию нейтрофилов выделяли из 10 мл гепаринизированной периферической венозной крови центрифугированием на двойном градиенте плотности фиколл – верографина с плотностью верхнего и нижнего 1,077 и 1,093 соответственно. После центрифугирования на границе между градиентами собирали кольцо нейтрофилов, дважды отмывали физиологическим раствором и доводили до концентрации $5 \cdot 10^6$ кл/л. Полученные таким образом клетки инкубировали 30 мин при 37^0С с эстриолом в физиологических концентрациях, соответствующих их уровню в периферической крови в первый (2 нг/мл), второй (10 нг/мл) и третий триместры беременности (20 нг/мл). Для контроля использовали взвесь нейтрофилов, инкубируемых в тех же условиях, без гормона. Окрашивали нейтрофильные ловушки рабочим раствором акридинового оранжевого. Учет проводили с помощью люминисцентного микроскопа и определяли процент клеток с сегментированным ядром, недифференцированным ядром и нейтрофильные внеклеточные ловушки [3]. Полученные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке на ПК. Достоверность различий определяли при помощи непараметрического критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Оценка влияния эстриола на способность нейтрофилов, выделенных из периферической крови, к образованию внеклеточных ловушек представлена в таблице. Установлено, что содержание морфологических форм нейтрофилов изменяется при действии эстриола независимо от его концентрации. При этом концентрация эстриола, соответствующая первому и третьему триместрам беременности, приводит к увеличению количества нейтрофилов с недифференцированным ядром, а концентрация эстриола, соответствующая второму триместру беременности, ведет к формированию внеклеточных ловушек нейтрофилами. Необходимо отметить, что процент нейтрофилов с неизмененной морфологией существенно снижается во всех группах при сравнении с контролем.

Известно, что период пребывания нейтрофилов в периферической крови составляет примерно 6-8 ч, далее они мигрируют в ткани, где обеспечивают защиту от инфекций [4], которая осуществляется не только путем фагоцитоза, но и, скорее всего, путем формирования НВЛ. Возможно, образование последних может быть од-

Таблица.

Влияние эстриола на способность нейтрофилов периферической крови к образованию ловушек (M±м, n=15)

№ группы	Группа	Показатель		
		Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ)		
		Нф с сегментир. ядром %	Нф с недиф. ядром %	НВЛ %
1	Контроль	58,7±4,6	27,8±4,2	13,3±1,9
2	Эстриол (2 нг/мл)	43,7±4,2 p_{1-2}=0,001	38,1±4,2 p_{1-2}=0,02	18,1±3,4
3	Эстриол (10 нг/мл)	39,6±5,0 p_{1-3}=0,002	36,3±3,9	24,0±3,7 p_{1-3}=0,001
4	Эстриол (20 нг/мл)	36,7±4,5 p_{1-4}=0,0008	45,9±3,8 p_{1-4}=0,001	17,4±2,4

Примечание. p - Статистически значимые различия показателей сравниваемых групп.

ним из эффективных механизмов обеспечения антимикробной устойчивости репродуктивного тракта матери и защиты плода от инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трунова Л.А. Иммунология репродукции. – Новосибирск: Наука, 1984. – 157с.

2. Долгушин И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: метод обнаружения и оценка эффективности улавливания бактерий // Микробиология. – 2009. – № 2. – С. 65–67.

3. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.

4. Brinkmann Volker, Arturo Zychlinsky. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // Science. – 2004. – V. 303. – P. 1532–1535.

Smirnova T.G., Savochkina A.Y., Dolgushin II., Shishkova Yu.S.

FORMATION EXTRACELLULAR TRAPS BY NEUTROPHILS ISOLATION FROM PERIPHERAL BLOOD INFLUENCED BY ESTRIOL

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia, www.chelsma.ru

Summary. The article presents the results of studies the effect estriol in concentrations corresponding to the first, second and third trimesters of pregnancy, the formation of neutrophil extracellular traps *in vitro*. It was determined that estriol at concentrations corresponding to the second trimester of pregnancy, leads to the formation of extracellular traps neutrophils isolated from peripheral blood.

Key words: neutrophil, neutrophil extracellular traps (NETs), estriol.

УДК 612.017.1:617.7-08:615.37

Усова В.В.[1], Шилов Ю.И.[1,2], Гаврилова Т.В.[1,2], Черешнева М.В.[3]

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1БЕТА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК КРОВИ С ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ПРИ ПРОНИКАЮЩЕМ РАНЕНИИ ГЛАЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВКЛЮЧЕНИЯ В ТЕРАПИЮ МИЕЛОПИДА

[1]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, chuprinavera@gmail.com, gavrilova.tv@mail.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, jshilov@mail.ru; [3]Учреждение Российской академии наук Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия, mchereshneva@mail.ru.

Резюме. У пострадавших с проникающим ранением глаза, получавших стандартную терапию, на 12-14-е сут травматического периода наблюдается повышение продукции интерлейкина-1бета в культурах клеток крови с липополисахаридом *Salmonella typhimurium*, при включении миелопида в комплексную терапию в эти же сроки продукция этого цитокина не отличается от контроля.

Ключевые слова: ранение глаза, липополисахарид, интерлейкин-1бета, миелопид.

Введение

Локальные и системные иммунные изменения играют важную роль в патогенезе проникающего ранения глаза (ПРГ). Показана эффективность применения отечественного иммуномодулятора миелопида в комплексной терапии пострадавших с ПРГ [1]. Однако многие аспекты иммуномодулирующего действия этого препарата при ПРГ изучены недостаточно. Повышение продукции интерлейкина-1бета (IL-1β) играет ключевую роль в развитии воспаления, иммунного ответа и других защитно-приспособительных реакций. В связи с этим представлялось целесообразным проанализировать изменение продукции этого цитокина в культурах с внесением липополисахарида (LPS) *Salmonella typhimurium*, являющегося лигандом нескольких типов паттерн-распознающих рецепторов [3].

Цель работы - исследование изменения продукции IL-1β в культурах клеток периферической крови с LPS *Salmonella typhimurium* у пострадавших с проникающим ранением глаза в зависимости от включения в комплексную терапию миелопида.

Материалы и методы исследования

Обследовано 20 пострадавших мужчин с ПРГ тяжелой степени в динамике: при поступлении в стационар (на 1-3-е сут после ранения до начала консервативной терапии) и после окончания курса терапии в стационаре (на 12-14-е сут травмы). Пострадавшие основной группы (10 человек) получали стандартную терапию в сочетании с миелопидом; пациенты группы сравнения (10 человек) - только стандартную терапию, включающую местное и общее применение антибактериальных препаратов, глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных и антигистаминных препаратов, ферментов, витаминов, антиоксидантов, осмотических, рассасывающих средств. Миелопид в дозе 3 мг/мл вводили лимфотропно и внутримышечно по 0,5 мл, начиная с 1-2-х сут после проведения первичной хирургической обработки ран 1 раз в день в течение 5 дней. Контрольную группу составили 10 практически здоровых мужчин-добровольцев.

Лейкоциты периферической крови выделяли методом спонтанной седиментации. Продукцию IL-1β оценивали в 24-часовых культурах с липополисахаридом (LPS) *Salmonella typhimurium* (Sigma, L6143, США) в концентрациях 0,1 и 1,0 нг/мл и без него. Культивирование клеток проводили в 96-луночных круглодонных планшетах в среде 199 с добавлением 10% аутоплазмы, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES, 100 мкг/мл гентамицина сульфата. Каждая культура содержала 2×10^5 лейкоцитов/лунку в 0,2 мл. Уровень IL-1β в супернатантах культур оценивали иммуноферментным методом с использованием тест-систем производства ООО “Протеиновый контур” (С.-Петербург). Статистический анализ результатов проводили с использованием критерия Дункана для множественного сравнения между группами и парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Внесение LPS в культуры клеток периферической крови практически здоровых добровольцев контрольной группы не приводит к изменению уровня продукции IL-1β (таблица), что, по-видимому, связано с ограничением эндогенной Грам-отрицательной микрофлорой ответа макроорганизма на LPS [3]. Сходные результаты получены и при оценке продукции IL-1β клетками здоровых людей при стимуляции LPS *E. coli* O26:B6 [2]. В раннем травматическом периоде внесение LPS в концентрации 0,1 нг/мл активирует продукцию IL-1β в сравнении с нестимулированными культурами, при этом уровни продукции IL-1β не

Таблица.
Изменение продукции IL-1β в культурах лимфоцитов периферической крови с LPS *Salmonella typhimurium* у пострадавших с ПРГ (пг/мл)

Концентрация LPS, нг/мл	Контрольная группа (n=10)	Первичное обследование пострадавших (n=20)	Повторное обследование пострадавших	
			миелопид + стандартная терапия (n=10)	стандартная терапия (n=10)
0	208,90±68,75	260,20±66,24	367,40±158,38	293,50±93,21
0,1	192,60±50,08	368,30±98,02#	385,70±130,57	463,20±127,00
1,0	209,80±62,98	348,80±110,22	341,10±116,55	603,20±170,40*#

Примечание. * - p<0,05 к контрольной группе по критерию Дункана; # - *p*<0,05 к культурам без митогена по *t*-критерию Стьюдента для парных данных; n - число наблюдений.

отличаются от контроля. При повторном обследовании пострадавших, получавших стандартную терапию, наблюдается активация LPS-индуцированной продукции IL-1β как по отношению к контрольной группе, так и к нестимулированным культурам при внесении 1,0 нг/мл LPS. У пациентов с включением в терапию миелопида не выявляется отличий от контрольной группы, внесение LPS не изменяет уровня IL-1β. Прослеживается одинаковая направленность действия миелопида на продукцию IL-1β в культурах с ранее описанной динамикой его концентрации *in vivo* [1].

Заключение

У пострадавших с ПРГ, получавших стандартную терапию, на 12-14-е сут травматического периода наблюдается повышение продукции IL-1β в культурах клеток крови с LPS *Salmonella typhimurium*, при включении миелопида в комплексную терапию в эти же сроки продукция этого цитокина не отличается от контроля.

Работа поддержана грантами РФФИ 10-04-96092р_урал_а, Программ Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и "Фундаментальные науки – медицине".

ЛИТЕРАТУРА

1. Черешнев В.А., Шилов Ю.И., Черешнева М.В. и др. Изменения функций иммунной системы и их коррекция миелопептидами при проникающем ранении глаза // Российский иммунологический журнал. – 2010. – Т. 4(13). № 3. – С. 225–236.

2. Gein S.V., Gorshkova K.G., Tendryakova S.P. Regulation of interleukin-1β and interleukin-8 production by agonists of μ and Δ opiate receptors *in vitro* // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2009. – V. 39(6). – P.591–595.

3. Broad A., Jones D.E., Kirby J.A. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy // Curr. Med. Chem. – 2006. – V. 13(21). – P. 2487–2502.

Usova V.V.[1], Shilov Ju.I.[1,2], Gavrilova T.V.[1,2], Chereshneva M.V.[3]

CHANGES OF INTERLEUKIN-1BETA PRODUCTION IN BLOOD CELL CULTURES WITH LIPOPOLYSACCHARIDE OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN PENETRATING EYE INJURY DEPENDING ON INCLUSION IN THERAPY MYELOPIDUM

[1]Academician E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, chuprinavera@gmail.com, gavrilova.tv@mail.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, jshilov@mail.ru; [3]Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russia, mchereshneva@mail.ru

Summary. The production of interleukin-1beta in the blood cell cultures with lipopolysaccharide *Salmonella typhimurium* was increased in patients with penetrating eye injure treated with conventional therapy on the 12-14th day of traumatic period. Production of this cytokine in the same period did not differ from control in case of inclusion of mielopidum in complex therapy.

Key words: eye injure, lipopolysaccharide, interleukin-1beta, mielopidum.

УДК 616-097

Харахорина Р.А., Долгих О.В., Лыхина Т.С.

МАРКЕРЫ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ГАПТЕННОЙ НАГРУЗКИ

Федеральное бюджетное учреждение науки "Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения", г. Пермь, Россия, itkinina-regina@yandex.ru, oleg@fcrisk.ru

Резюме. В работе показано участие экзогенных химических соединений в развитии аллергопатологии у детей. Установлено, что у детей с повышенной контаминацией формальдегида, марганца и хрома в крови наблюдается одновременная активация синтеза сывороточных реагиновых иммуноглобулинов и лейкотриенов C4/D4/E4, что говорит об участии в развитии аллергической реакции реагинового механизма повреждения тканей наряду с лейкотриеновым. Таким образом, для оценки участия гаптенов в инициации гиперэргии, помимо маркеров реагиновой сенсибилизации, необходима идентификация метаболитов арахидоновой кислоты, в частности, лейкотриенов C4/D4/E4.

Ключевые слова: аллергические заболевания, лейкотриены, общий IgE, антигенспецифический IgE.

Введение

По данным эпидемиологических исследований, в последние десятилетия отмечается непрерывный рост числа аллергических заболеваний. Известно, что тяжелые металлы и органические соединения являются гаптенами и способны после соединения с белками приобретать антигенные свойства, запускать, а затем и поддерживать аллергический процесс [1].

Аллергические реакции относят к реакциям гиперчувствительности, опосредованным, прежде всего, иммунологическими механизмами. Ведущая роль в развитии аллергии отводится реагиновому механизму повреждения тканей, но все большее внимание в возникновении и поддержании аллергического воспаления уделяется метаболитам арахидоновой кислоты, в том числе лейкотриенам (ЛТ) C4/D4/E4, являющимся ведущими медиаторами аллергического воспаления поздней фазы [2].

Цель – анализ маркеров аллергических реакций у детей в условиях воздействия техногенных гаптенов различной химической структуры.

Материалы и методы исследования

Всего обследовано 43 ребенка, в возрасте от 3 до 13 лет, имеющих в анамнезе аллергопатологию. Дети были разделены на 2 группы в зависимости от концентрации химических соединений в крови. Основную группу составили 36 детей с повышенным содержанием формальдегида и тяжелых металлов в крови. Группа сравнения включала 7 детей с допустимым содержанием исследуемых соединений. Основная группа и группа сравнения были сопоставимы по полу, возрасту и соматической заболеваемости.

Исследование биосред (цельная кровь) на содержание металлов (марганец, хром) выполнено методом атомно-абсорбционного анализа. Определение органических соединений (формальдегид) выполнялось методом капиллярной газовой хроматографии.

Концентрацию сывороточных реагиновых иммуноглобулинов (общий IgE, антигенспецифический IgE) и ЛТ определяли методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем фирм "Хема-Медика" (Россия), "Euroimmun" (Германия) и "Neogen Corporation" (США) на микропланшетном анализаторе El_x808IU "Bio-Tek Instruments" (США). Для количественного определения ЛТ предварительно проводили процедуру их экстракции из плазмы крови. Плазму крови доводили до pH=3,5. Подготовленный образец элюи-

ровали через колонку C_{18} Sep-Pak (Waters Corporation, США) со скоростью 1 мл/мин. Остаток эйкозаноидов смывали 2 мл метанола, который в дальнейшем выпаривали с помощью модульного концентратора DUO (miVac, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office, Microsoft Excel и дополнительной программы статистического анализа Statistica 6.0. Достоверность различий между группами считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате оценки уровня контаминации биосред выделены группы детей с повышенным содержанием химических соединений в крови. При этом средние показатели содержания формальдегида, марганца и хрома в крови достоверно ($p<0,05$) превысили в 3,28; 1,55 и 1,45 раз соответственно референтные уровни их содержания.

У детей с повышенной контаминантной нагрузкой обнаружена тенденция к увеличению уровня общего IgE в сыворотке крови.

В процессе исследования нами проведена количественная оценка специфических IgE-антител к формальдегиду, марганцу и хрому. IgE специфический к формальдегиду в группе детей с повышенной контаминацией гаптена составил 6,42±2,70 МЕ/мл, что превышает в 2,78 раз содержание IgE специфического в группе детей с допустимым уровнем формальдегида (2,31±0,86 МЕ/мл). При определении специфических IgE-антител к марганцу и хрому обнаружено увеличение исследуемых показателей в 2,19 и 3,52 раз соответственно в группах с повышенной концентрацией марганца и хрома по отношению к группам сравнения.

При количественной оценке лейкотриенов C4/D4/E4 нами установлено повышение их содержания в группах детей с повышенным уровнем формальдегида, марганца и хрома в крови (0,492±0,165 нг/мл; 0,453±0,091 нг/мл и 0,421±0,083 нг/мл соответственно) по отношению к группам сравнения (0,398±0,064 нг/мл; 0,383±0,079 нг/мл и 0,238±0,109 нг/мл).

Выявлено, что у большинства детей с повышенной контаминантной нагрузкой наблюдается одновременное увеличение содержания общего IgE и ЛТ по сравнению с детьми с допустимым уровнем химических соединений в крови. Так, в среднем у 44% детей с повышенным содержанием формальдегида, марганца и хрома наблюдается одновременное увеличение концентрации IgE общего и ЛТ, что говорит об участии в развитии гиперчувствительности реагинового механизма повреждения тканей наряду с лейкотриеновым, в то время, как одновременное повышение этих показателей в группе с допустимым содержанием исследуемых гаптенов наблюдалось в среднем у 20% детей.

Таким образом, установлено участие экзогенных химических соединений в реализации не только реагинового, но и лейкотриенового механизмов аллергопатологии у детей, при этом в случае повышенной контаминации экзогенных аллергенов задействуются преимущественно оба механизма одновременно. Следовательно, для ответа на вопрос об участии гаптенов в инициации гиперэргии помимо маркеров реагиновой сенсибилизации необходима идентификация метаболитов арахидоновой кислоты, в частности, лейкотриенов C4/D4/E4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Долгих О.В., Лыхина Т.С.* Особенности содержания специфического IgE и уровня раннего и позднего маркеров клеточной активации у детей с аллергопатологией в условиях техногенной нагрузки // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/2. – С. 84–85.

2. *Раскина Е.В., Недельская С.Н.* Лейкотриеновый путь воспаления при бронхиальной астме у детей и методы его коррекции // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – №. 2. – С. 111–113.

Kharakhorina R.A., Dolgikh O.V., Lykhina T.S.

MARKERS OF ALLERGIC REACTIONS IN CHILDREN UNDER CHEMICAL LOAD

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia,

itkinina-regina@yandex.ru, oleg@fcrisk.ru

Summary. In this article we have defined the participation of exogenous chemical compounds in the development of allergic reactions in children. We have determined that in children with elevated concentration of formic aldehyde, manganese and chrome the concurrent activation of synthesis of blood serum reagin immunoglobulins and leukotrienes C4/D4/E4 was observed. The data indicate the involvement of reagin mechanism of tissue damage along with a leukotriene mechanism in the development of allergic reaction. Thus, the identification of metabolites of arachidonic acid, in particular leukotrienes C4/D4/E4, and markers of reagin sensibilization is necessary for a definition of allergen participation in the development of allergic diseases.

Key words: allergic diseases, leukotrienes, total IgE, antigen-specific IgE

УДК 616-008.853.3

Хонина Н.А.,[1] Селедцова Н.В.,[2] Тихонова М.А. [1], Черных Е.Р.[1]

ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА У БЕРЕМЕННЫХ С НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ ГИПЕРАНДРОГЕНИЕЙ

[1]Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск, Россия, nkhonina@mail.ru; [2] Закрытое акционерное общество автономная некоммерческая организация “Центр Новых Медицинских Технологий в Академгородке”, г. Новосибирск, Россия

Резюме: Работа посвящена исследованию параметров иммунитета у беременных с гиперандрогенией надпочечникового генеза, у которых значительно повышен уровень дегидроэпиандростерона сульфата, и здоровых беременных. Показано, что дендритные клетки (ДК) беременных с гиперандрогенией, культивируемые в присутствии IFNα, характеризуются более зрелым фенотипом (CD83+) и усилением экспрессии активационного маркера (CD25+). В периферической крови у беременных с гиперандрогенией регистрируется достоверно более низкое содержание регуляторных CD4+CD25+ Т-клеток, в том числе с высокой экспрессией CD25 антигена. Снижение генерации регуляторных Т-клеток вследствие утраты толерогенного потенциала зрелыми ДК рассматривается как один из возможных механизмов срыва толерантности и привычного невынашивания у беременных с гиперандрогенией.

Ключевые слова: дендритные клетки, регуляторные Т-клетки, невынашивание беременности, гиперандрогения

Введение

Известно, что формирование иммунологической толерантности к аллоантигенам плода является необходимым условием физиологического течения беременности Simon. В индукции толерантности особое значение придается клеткам с иммуносупрессорной активностью, среди которых важная роль отводится регуляторным Т-клеткам (Т-рег) и дендритным клеткам (ДК) [1, 2]. Согласно данным литературы ДК беременных характеризуются рядом отличительных свойств по сравнению с ДК небеременных. Так, ДК беременных несут маркеры миелоидных ДК, но проявляют супрессорные свойства, характерные для плазмоцитоидных ДК [3]. Регуляторные $CD4^+CD25^+$ клетки контролируют иммунный ответ Т-клеток на аллоантигены и поэтому, согласно исследованиям, их содержание остается повышенным в течение всего периода беременности [4]. Изменения содержания и функциональных свойств Т-рег и ДК при беременности могут быть обусловлены нарушениями продукции половых гормонов, что в конечном итоге приводит к невынашиванию беременности. Ранее было выявлено иммуномодулирующее влияние гормона коры надпочечников - дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС), которое проявлялось стимулирующим эффектом в отношении цитотоксической функции NK-клеток [5], а также пролиферативной и цитокин-секреторной активности Т-лимфоцитов [6]. Согласно ранее полученным данным, у беременных с повышенным уровнем ДГЭАС при надпочечнико-

вой гиперандрогении (ГА) наиболее часто развиваются ранние гестационные осложнения, сопровождающиеся спонтанными выкидышами [7]. Учитывая, что повышенный уровень ДГЭАС сопряжен с активацией иммунной системы, можно предполагать, что у беременных с ГА может быть недостаточно эффективна иммуносупрессорная перестройка и, как следствие, нарушено формирование толерантности иммунной системы матери к аллоантигенам плода. В этом аспекте характеристика Т-рег и ДК у здоровых беременных и беременных с ГА представляется актуальной задачей, позволяющей выявить механизмы нарушения формирования толерантности при беременности.

Материалы и методы исследования

Параметры иммунитета определяли у здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста (n=25) и в двух группах беременных. В первую группу вошли беременные с надпочечниковой гиперандрогенией (n=20), вторая группа включала беременных без эндокринной патологии (n=26). Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту (26,2±0,5 и 25,9±0,4 лет, соответственно) и срокам беременности (14,8±0,4 и 13,5±0,3 недель гестации, соответственно). В подгруппе беременных с ГА средняя концентрация ДГЭАС составила 3,8 ± 0,6 мкг/мл, что было достоверно выше среднего уровня гормона в подгруппе здоровых беременных (0,6 ± 0,1 мкг/мл). Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК во флаконах для культивирования в присутствии GM-CSF (Leucomax, Шеринг-Плау, Швейцария) 1000 Ед/мл и INF-α (Роферон-А, Roche, Швейцария) 1000 Ед/мл. Затем ДК культивировали 24 часа в присутствии дозревающего стимула (LPS, 10 мг/мл, Sigma, США).Содержание регуляторных Т-клеток и ДК определяли методами одно- и двуцветной проточной цитофлюориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson), используя соответствующие анти-CD3-,CD4,-CD25,-CD14,-CD83 моноклональные антитела (“Сорбент”, Москва; BD PharMingen, США).

Результаты и обсуждения

Фенотипический анализ генерированных IFN-ДК показал, что по сравнению с небеременными женщинами при физиологической гестации относительное количество клеток с фенотипом зрелых (CD83+) и активированных ДК (CD25+) было снижено в 2 раза (4,3±0,9 vs 8,4±1,7%; p<0,05). У беременных с ГА, напротив, экспрессия CD83+, CD25+ и CD14+ молекул была в 2,5 раза выше, чем у здоровых беременных. Характерно, что наряду с повышенным содержанием CD14+CD83+ДК с промежуточной степенью зрелости у беременных с ГА также отмечалось более высокое количество зрелых ДК с фенотипом CD14-CD83+ клеток. В конечном итоге общее число CD83+ клеток у беременных с ГА в 2,5 раза превышало аналогичный показатель у здоровых беременных (25,9±1,9 vs 9,3±1,3%; p<0,01). Известно, что толерогенная активность ДК может опосредоваться через активацию супрессорных $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоцитов [8]. Показано, что ДК, продуцирующие IL-10, способны индуцировать генерацию Т-рег, которые подавляют Т-клеточный ответ на аллоантигены. Сравнительное исследование относительного содержания Т-рег в периферической крови у небеременных женщин и здоровых беременных показало, что в первой половине физиологической беременности в периферической крови регистрируется трехкратное увеличение доли регуляторных $CD4^+CD25^+$Т-клеток, в том числе с высокой экспрессией CD25 ($CD4^+CD25^{high}$). У беременных с повышенным сывороточным уровнем ДГЭАС число $CD4^+CD25^+$Т-рег увеличивается незначительно и остается достоверно ниже, чем у здоровых беременных (7,6±0,7 vs 12,9±1,4 %; p<0,05). Содержание $CD4^+CD25^{high}$ клеток у беременных с ГА также снижено (1,1±0,2 vs 2,4±0,3%; p<0,05) и не отличается от аналогичного показателя у небеременных.

Заключение

Таким образом, при гиперандрогении формируется пул активированных зрелых CD83+ДК, которые, согласно данным литературы, приобретают способность стимулировать созревание Т-лимфоцитов [10, 9] и утрачивают способность индуцировать генерацию Т-рег [11]. Полученные нами данные о повышении числа CD83+ДК в периферической циркуляции у беременных с осложненным течением гестации согласуются с данными других авторов. Согласно исследованиям в децидуальной ткани женщин с синдромом потери плода регистрируется значительно больше CD83+ДК, чем при физиологической беременности. Более того, наличие зрелых ДК в децидуальной ткани коррелирует с высокой частотой невынашивания беременности. Вероятно, при гиперандрогении активация и созревание ДК сопровождается утратой их толерогенного потенциала, при отсутствии которого снижается генерация Т-рег, контролирующих активность аллоантигенраспознающих Т-лимфоцитов. В качестве сигнала, активирующего ДК, может выступать ДГЭАС, который обладает иммунорегуляторными свойствами и способен индуцировать дифференцировку и созревание ДК. В совокупности выявленные иммунные дисфункции у беременных с ГА могут нарушать формирование толерантности к аллоантигенам плода, что сопровождается развитием спонтанных выкидышей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kammerer U., Kruise A., Barrentos G.* Role of dendritic cells in the regulation of maternal immune responses to the fetus during mammalian gestation. // Immunol. Invest. – 2008. – V. 37. – P. 499–533.
2. *Хонина Н.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р.* Иммунные дисфункции при бесплодии неясного генеза. // Проблемы репродукции. – 2010. – № 1. – С. 57–63.
3. *Miyazaki S., Tsuda H., Sakai M., Hori S.* Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy deciduas. // J.Leukoc.Biol. – 2003. – V. 74. – P. 514–522.
4. *Gueri L.R., Prins J.R., Robertson S.A.* Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment // Human Reprod Update. – 2009. – V. 1. – P. 1–19.
5. *Dosiou C, Giudice LC.* Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives // Endocrine Rev. – 2005. – V. 26. № 1. – P. 44–62.
6. *Schifitto G., McDermott M.P., Evans T. et al.* Autonomic performance and dehydroepiandrosterone sulfate levels in HIV-1-infected individuals: relationship to TH1 and TH2 cytokine profile // Arch Neurol. – 2000. – V. 57. N. 7. – P. 1027–32.
7. *Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Дударева А.В. и др.* Параметры Т-клеточного иммунитета у беременных с повышенным и нормальным уровнем сывороточного дегидроэпиандростерона сульфата / /Мед. иммунология. – 2006. – Т. 8. № 2. – С. 319–320.
8. *Barratt-Boyes S.M.., Thompson A.W.*Dendritic cells: tools and targets for transplant tolerance. // Am.J.Transplant. – 2005. – V. 5. – P. 2807–2813.
9. *Breloer M., Fleischer B.* CD83 regulate lymphocyte maturation, activation and homeostasis. // Trends. Immunol. – 2008. – V. 29. – P. 186–194.
10. *Cao W., Lee S.H., Lu J.* CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. // Biochem. – 2005. – V. 1. – P. 85–93.
11. *Blios S.M., Kammerer U., Soto C.A.* Dendritic cells: key to fetal tolerance? // Biol.Reprod. – 2007. – V. 77. – P. 590–598.

Khonina N.A.[1], Seledtsova N.V.[2], Tichonova M.F.[1], Chernykh E.R.[1]

IMMUNE DYSFUNCTIONS IN PREGNANT WOMEN WITH SUPRARENAL HYPERANDROGENIA

[1]Research Institute of Clinacal Immunology, Novosibirsk, Russia, nkhonina@mail.ru; [2]Novel Medical Technologies Centre in Academcity, Novosibirsk, Russia

Summary. The parameters of immunity in pregnant women with suprarenal hyperandrogenia, which significantly raised the level of dehydroepiandrosterone sulfate, and healthy pregnant women were investigated. It is shown that DC in pregnant women with hyperandrogenism cultured in the presence of IFNα characterized by a more mature phenotype (CD83+) and increased expression of activation markers (CD25+). In the peripheral blood of pregnant women with hyperandrogenism recorded significantly lower content of regulatory CD4+CD25+ T cells, including those with high expression CD25 antigen. Reducing the generation of regulatory T-cells due to loss of tolerogenic potential of mature DCs is considered as one possible mechanism of failure tolerance and pregnancy loss in pregnant women with hyperandrogenia.

Key words: dendritic cells, regulatory T- cells, pregnancy loss, hyperandrogenism suprarenal hyperandrogenia

УДК 616.438-089.87

Хромцова Г.А., Логинова Н.П., Четвертных В.А., Щеголева Т.А.

ТИМУС НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКАХ СЕРДЦА

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, gala197959@yandex.ru

Резюме. Тимус является центральным органом иммуногенеза, определяющим состояние иммунной системы любого субъекта, особенно в детском возрасте. Следовательно, морфологические сдвиги в структуре тимуса есть та основа, по которой решается вопрос дефекта иммунной системы. У детей с врожденным пороком сердца имеются выраженные морфологические изменения в структуре тимуса, влияющие на развитие в нем Т-лимфоцитов и субпопуляционное их соотношение.

Ключевые слова: тимус, акцидентальная инволюция, новорожденные, порок сердца.

Введение

Известно, что функция любого органа, включая тимус, находится в тесной взаимосвязи с его строением. При этом различные заболевания как инфекционной, так и неинфекционной природы могут вызывать нарушение структуры тимуса, что может служить причиной развития разной степени тяжести акцидентальной инволюции. Известно, что в патогенезе врожденных пороков сердца лежит механизм нарушения системной гемодинамики, что ведет к развитию тканевой гипоксии со всеми вытекающими отсюда последствиями.

Целью исследования явилось изучение морфологических и иммунофенотипических особенностей строения тимуса у детей с врожденными, с разной степени сложности, пороками сердца.

Материалы и методы исследования

Тимус для исследования был получен от 28 детей первого года жизни при операциях, проводимых по поводу врожденного порока сердца в Институте сердца г. Перми. Часть органа забирали на гистологическое исследование. Материал обрабатывали общепринятым методом: заливка в парафин с последующей окраской срезов гематоксилин-эозином, по ван Гизону, Футу и по Шубичу. Оставшуюся часть органа измельчали, путем пипетирования выделяли тимоциты и с помощью моноклональных антител (МкАТ), меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE), оценивали их фенотип ($CD3^{hi}$; $CD4^+$ $CD8^-$; $CD4^-$ $CD8^+$).

Результаты и обсуждение

При различных врожденных пороках сердца тимус имел изменения разной степени выраженности. Были выделены 2 группы детей: первая – с синими пороками сердца (тетрада Фалло, транспозиция магистральных сосудов), вторая – с белыми пороками (дефект межжелудочковой перегородки, дефект межпредсердной перегородки).

У детей первой группы (n=13) в тимусе наблюдали более значительные расстройства кровообращения. Все сосуды, как правило, были расширены и заполнены кровью. Во многих из них выявлялись гемолизированные эритроциты. Вокруг сосудов в междольковой соединительной ткани формировались грубые коллагеновые волокна. Более того, разрастание коллагеновых волокон отмечали также в корковом и в мозговом веществе долек. В междольковой соединительной ткани выявлялась жировая ткань, представленная как крупными, так и единичными скоплениями адипоцитов. Местами соединительная ткань врастала в дольки, частично замещая их функциональную часть. В этих участках дольки формировался неровный край, чаще фестончатый. В дольках наблюдали образование кист и частичное опустошение коркового вещества за счет гибели лимфоцитов и вытеснения их тимическими тельцами. Последние находились на разной стадии развития, часто формируя довольно крупные структуры. Общее количество их в органе возрастало. В субкапсулярной части долек тимуса имелись признаки дистрофических изменений клеток стромы, теряющих связь с лимфоцитами и тем самым формирующих зоны “отчуждения”. Это приводило к гнездному опустошению коры с нередким развитием здесь жировой ткани. Можно предположить, что появление адипоцитов – это вариант репаративной пролиферации клеток соединительной ткани. Повсеместно выявлялись также фибробласты и скопление гибнущих клеток, находящихся в состоянии апоптоза. В корковой части долек выявлялись мелкоочаговые кровоизлияния. Повсеместно в тканях тимуса одиночно или группами выявлялись мастоциты. Тучные клетки имели разные размеры, цитоплазма была заполнена гранулами, часть клеток находилась на стадии дегрануляции. В этих участках был резче выражен отек стромы и соединительнотканных структур. Находясь между лимфоцитами в коре, тучные клетки нередко формировали масто-лимфоцитарные розетки. Дегрануляция мастоцитов носила чаще направленный характер именно в сторону скопления тимоцитов. Во внутридольковом периваскулярном пространстве кортико-медулярной зоны отмечались переполненные сосуды с явлением диапедеза эритроцитов. В таких участках также определялись крупные тучные клетки, единично располагаясь вдоль сосудов.

Во второй группе детей (n=15) в тимусе наблюдали менее выраженные отек стромы и полнокровие сосудов. В корковом веществе долек формировалась так называемая картина “звездного неба” (как результат увеличения количества макрофагов). Макрофаги были плотно окружены лимфоцитами; формировались зоны умеренного опустошения коры с участками очаговых скоплений лимфоцитов. В мозговом веществе по всей его площади выявлялись тельца Гассаля разного размера. Явления гипоксии и здесь вызвали реактивные изменения тучных клеток. Мастоциты концентрировались группами, преимущественно вблизи сосудов междольковой соединительной ткани и кортико-медулярной зоны. В этих участках наблюдали умеренный отек тканевых элементов с лейкоцитарной их инфильтрацией.

Далее, в тимусе, благодаря специализированному микроокружению, Т-лимфоциты проходят определенные этапы дифференцировки. Однако изменения в структуре органа в той или иной мере отражались на процессе дифференцировки Т-лимфоцитов. В частности, наши исследования показали, что исходный уровень экспрессии тимоцитов был неоднородный. Так, у детей 1 группы количество тимоцитов $CD3^{hi}$ было выше среднего значения (23,7+3,94%), составляя 38,5%. Во 2-ой группе у 61,5% обследуемых детей количество тимоцитов, экспрессирующих $CD3^{hi}$, было ниже среднего значения – 19,9%. Анализ перераспределения двух основных субпопуляций тимоцитов – $CD4^-$ $CD8^+$ и $CD4^+$ $CD8^-$ выявил, что во 2-й группе детей (с исходно низким уровнем тимоцитов) содержание $CD4^-$ $CD8^+$ было выше на 59,5%, а уровень $CD4^+$ $CD8^-$ составил 40,0%.

Заключение

Таким образом, полученные данные показывают, что у детей с врожденным пороком сердца, независимо от степени его тяжести, развиваются ранние инволютивные изменения, больше выраженные у 1-ой группы детей. Кроме того, у детей этой же группы резко нарушены процессы дифференцировки тимоцитов, что неминуемо предопределяет значительный дефицит у них Т-клеточного звена иммунитета.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 11-04-96023 р_урал_а).

Chromtsova G.A., Loginova N.P., Chetvertnyck V.A., Shchegoleva T.A.

THYMUS IN NEWBORN CONGENITAL HEART DISEASE

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Ministry of Health, Perm, Russia, gala197959@yandex.ru

Summary. The thymus is the central organ of immunogenesis determining the immune status of any person, especially in childhood. Consequently, the morphological changes in the structure of the thymus are precisely the foundation on which the issue of immune system deficiency is solved . In children with congenital heart disease morphological changes in the structure of the thymus gland which influence the development of its T-lymphocyte subpopulation and their relationship have been revealed.

Key words: thymus, accidental involution, newborns, heart defect

УДК 615.276.2/.4.015.44

Шаравьёва И.Л.[1], Гейн С.В.[1,2], Тендрякова С.П.[1,2]

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, gein@iegm.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия

Резюме. Ротационный стресс стимулировал антителогенез, спонтанную пролиферацию, а также спонтанную и конконовалин А индуцированную продукцию IL-1β спленоцитами. Иммобилизационный стресс, напротив, угнетал количество антителообразующих клеток в селезёнке, снижал интенсивность спонтанного и стимулированного Кон А захвата 3Н-тимидина спленоцитами и не влиял на продукцию IL-1β. Блокада опиатных рецепторов налоксоном нивелировала как стимулирующий эффект ротационного, так и угнетающий эффект иммобилизационного стресса на антителогенез и пролиферацию. Усиление продукции IL-1β при ротации нивелировалось налоксоном только в спонтанных культурах.

Ключевые слова: опиатные рецепторы, спленоциты, IL-1β, ротационный стресс, иммобилизационный стресс.

Введение

Опиоидные пептиды – большая группа физиологически активных биорегуляторных факторов, реализующая свои эффекты через взаимодействие с опиатными рецепторами (μ, Δ, κ). Опиоидные пептиды принимают участие в регуляции целого ряда жизненно важных функций в физиологических и экстремальных условиях [1]. При стрессах, травмах, психоэмоциональных состояниях и физических нагрузках опиоидные пептиды играют решающую роль в регуляции иммунных реакций как на местном, так и на системном уровнях за счёт выброса бета-эндорфина в периферическую кровь. Несмотря на общий механизм патогенеза, различные виды наиболее часто встречающихся стрессорных воздействий (вращение, ограничение подвижности, переохлаждение и др.) могут значительно различаться по степени выраженности гормональных изменений и, как следствие, своему влиянию на иммунный ответ [3]. Цель работы – исследовать влияние блокады опиатных рецепторов на функции иммунной системы при ротационном и иммобилизационном стрессе *in vivo*.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на беспородных мышах-самцах средней массой 18-20 г. Ротация мышей производилась в течение 60 мин по 10 мин с перерывами по 5 мин при 78 об/мин, иммобилизация мышей проводилась в течение 6 ч (фиксация в положении на спине). Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид в дозе 0,2 мг/кг (“Narcan”, США) вводили подкожно за 20 мин до стресса, а также через 3 ч после начала стресса у животных, подвергнутых иммобилизации. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я - контрольная, 2-я – стресс (ротационный или иммобилизационный), 3-я - стресс на фоне налоксона, 4-я - введение одного налоксона. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия одномоментно иммунизировали эритроцитами барана внутрибрюшинно однократно (10^8 клеток в 0,2 мл 0,9% NaCl). На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке. Другую половину животных сразу после окончания стресса выводили из эксперимента, извлекали селезёнки, гомогенизировали в пластиковом гомогенизаторе, полученные спленоциты дважды отмывали холодной средой RPMI-1640. Пролиферативную активность оценивали через 72 ч по интенсивности включения ^{3}Н-метилтимидина. Статистический анализ результатов проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента для межгруппового сравнения.

Результаты и обсуждение

В условиях системной иммунизации у мышей, подвергнутых ротационному стрессу в период индукции иммунного ответа, наблюдалось статистически значимое усиление интенсивности образования АОК в абсолютном выражении. На фоне налоксона стимулирующее действие стресса на абсолютное число АОК отменялось. При изолированном введении блокаторов опиатных рецепторов количество АОК не отличалось от показателей контрольной группы. В условиях системной иммунизации у мышей, подвергнутых иммобилизационному стрессу, напротив, наблюдается статистически значимое угнетение интенсивности образования АОК, которое нивелируется предварительным введением налоксона. Изолированное введение налоксона, как уже было показано выше, какого-либо значимого влияния на динамику количества АОК не оказывало. Установлено, что у мышей, подвергнутых ротации, увеличивалась спонтанная пролиферативная активность спленоцитов. Введение налоксона приводило к отмене стресс-индуцированного усиления пролиферативного ответа спленоцитов. Внесение в культуры поликлонального активатора конканавалина А (Кон А) приводило к выраженному усилению захвата ^{3}Н-тимидина спленоцитами по сравнению с нестимулированными культурами, в то же время статистически значимого влияния ротационного стресса на пролиферацию в стимулированных культурах зафиксировано не было.

Установлено, что иммобилизационный стресс снижал пролиферативную активность спленоцитов как в неактивированных культурах, так и в присутствии Кон А. Блокада μ-рецепторов на фоне иммобилизационного стресса приводила к отмене угнетающего действия как на спонтанный, так и на Кон А-стимулированный пролиферативный ответ спленоцитов. Изолированное введение блокаторов статистически значимо динамику захвата радиоактивной метки спленоцитами не изменяло.

Заключение

Таким образом, хотелось бы обратить внимание на существующие различия в направленности иммунорегуляторного действия эндогенных опиоидных пептидов, зависящих от вида стрессорного воздействия. В условиях более лёгкого ротационного стресса через опиатные рецепторы опосредуются эффекты стимулирующей направленности, а в условиях иммобилизации – преимущественно угнетающей. Отсутствие отмены налоксоном эффектов опиоидных пептидов – явление, неоднократно описанное в литературе, и может объясняться присутствием на клетках рецепторов к β-эндорфину, не блокируемых классическими опиатными антагонистами, а также собственными агонистическими эффектами опиатных антагонистов, в частности, налоксона [2].

Работа поддержана грантом программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и грантом РФФИ № 11-04-96000-р-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врожденного иммунитета (обзор) // Биохимия. – 2011. – Т. 76. № 3. – С. 379–390.

2. Ковалицкая Ю.А., Наволоцкая Е.В. Неопиоидное действие бета-эндорфина: обзор // Биохимия. – 2011. – Т. 76. № 4. – С. 469–486.

3. Bowers S.L., Bilbo S.D., Dhabhar F.S., Nelson R.J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice // Brain Behav. Immun. – 2008. – V. 22. N. 1. – P. 105–113.

Sharavieva I.L.[1], Gein S.V.[1,2], Tendrjakova S.P.[1,2]

INFLUNCE OF OPIATE RECEPTORS BLOCADE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF SPLENOSYTES UNDER STRESS

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, gein@iegm.ru; [2]Perm State National Research University, Perm, Russia

Summary. Rotational stress was found to promote antibody response, spontaneous proliferation, as well as spontaneous and ConA-induced ones and IL-1 beta production by splenocytes. In contrast, immobilization stress suppressed the AFC number in spleen, lowered the intensity of spontaneous and ConA-promoted 3H-thymidine capture by splenocytes and did not affect IL-1 beta production. It was observed that opiate receptor blockade with naloxone leveled both promoting effect of rotational and suppressive effect of immobilization stress on antibody response and proliferation. Enhancing of IL-1beta production under rotation was leveled with naloxone just in spontaneous cultures.

Key words: opiate receptors, splenocytes, IL-1β, rotation stress, immobilization stress

УДК 612.017.1:615.217.22:612.018

Шилов Д.Ю.[1,2]

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АДРЕНАЛИНА И ГИДРОКОРТИЗОНА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ В КУЛЬТУРАХ С КОНКАНАВАЛИНОМ А *IN VITRO*

[1]Учреждение Российской академии Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, Россия; [2]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная медицинская академия имени акададемика Е.А. Вагнера” Минздравсоцразвития России, Пермь, Россия, shilov-dj@mail.ru

Резюме. Адреналина гидрохлорид (10^{-6} М) в культурах с 10 и 40 мкг/мл конканавалина А (Кон А) приводит к угнетению пролиферации лимфоцитов. Супрессивный эффект гидрокортизона (10^{-6} М) более выражен и проявляется при всех концентрациях Кон А. Синергизм иммуносупрессивного действия адреналина и гидрокортизона отмечается при их совместном внесении в культуры с концентрацией Кон А 40 мкг/мл. При низких уровнях митогена (2,5 и 5 мкг/мл Кон А) наблюдается антагонизм действия этих соединений.

Ключевые слова: адреналин, адренорецепторы, глюкокортикоиды, лимфоциты.

Введение

Молекулярные механизмы взаимодействия глюкокортикоидов и катехоламинов рассматриваются в двух аспектах: 1) способности глюкокортикоидов изменять экспрессию адренорецепторов и трансдукцию с них сигнала; 2) модуляции катехоламинами действия глюкокортикоидов на уровне передачи сигнала через внутриклеточные гормонсвязывающие рецепторы [2]. Последствия реализации взаимодействия глюкокортикоидов и катехоламинов на уровне иммунной системы изучены недостаточно.

Цель работы – исследование взаимодействия адреналина и гидрокортизона в регуляции пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах с Кон А *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин (1,077 г/см^3) из периферической крови 7 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 19 до 27 лет (средний возраст – 21 год). Пролиферацию лимфоцитов оценивали в культурах с Т-клеточным митогеном конканавалином А (Кон А, Boehringer Mannheim GmbH, No.1296779, Германия) в концентрациях 2,5, 10, 20 и 40 мкг/мл и без него. Каждая культура содержала 2x 10^5 мононукларных клеток в 0,2 мл среды 199 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES, 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% аутоплазмы на лунку круглодонного 96-луночного планшета. Метил-^{3}Н-тимидин (Радиевый институт им. В.Г. Хлопина, Санкт-Петербург) вносили по 1 мкКи через 48 ч от начала культивирования во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37^{0}С. Через 24 ч культивирования клетки осаждали на мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Уровень радиоактивности в кислотонерастворимой фракции оценивали на жидкостном сцинтилляционном счетчике “Guardian” WinSpectral DSA 1414-03 (“Wallac”, Финляндия). Результаты выражали в имп/мин. Использовали следующие соединения: агонист всех типов адренорецепторов адреналина гидрохлорид (ФГУП “Московский эндокринный завод”, Москва, Россия) в концентрации 10^{-6} М; гидрокортизон (Sigma, H-0888, США) в концентрации 10^{-6} М. Все исследуемые соединения вносили в культуры одновременно с митогеном. Контролем служили пробы без препаратов. Статистический анализ результатов проводили с использованием критерия Дункана (Duncan’s test) для множественного сравнения парных данных.

Результаты и обсуждение

Установлено, что внесение в культуры неселективного агониста всех типов адренорецепторов адреналина гидрохлорида в концентрации 10^{-6} М приводит к статистически значимому угнетению пролиферативного ответа лимфоцитов только в культурах с концентрацией Кон А 10 и 40 мкг/мл (таблица). Гидрокортизон в концентрации 10^{-6} статистически значимо угнетает пролиферацию лимфоцитов в культурах со всеми концентрациями Кон А. При совместном внесении в культуры адреналина гидрохлорида и гидрокортизона выявляется выраженный синергизм иммуносупрессивного действия обоих препаратов, проявляющийся в появлении выраженного снижения уровня пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах с Кон А в концентрации 40 мкг/мл. В культурах с субоптимальными концентрациями Кон А (2,5 и 5 мкг/мл) адреналина гидрохлорид снижает выраженность супрессивного действия гидрокортизона. Подобная зависимость, возможно, связана с особенностями изменения функциональной экспрессии α_1-, α_2- и β-адренорецепторов, а также глюкокортикоидных рецепторов в условиях разной степени выраженности активации клеток митогеном [1].

Заключение

Характер взаимодействия неселективного агониста всех типов адренорецепторов адреналина гидрохлорида и гидрокортизона в регуляции пролиферативного ответа лимфоцитов, проявляющийся в виде синергизма или антагонизма, зависит от концентрации митогена.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., Frigo G.* Unravelling dopamine (and catecholamine) physiopharmacology in lymphocytes: open questions // Trends Immunol. – 2003. – V.24 (11). – P. 581–583.

2. *Warner A., Ovadia H., Tarcic N., Weidenfeld J.* The effect of restraint stress on glucocorticoid receptors in mouse spleen lymphocytes: involvement of the sympathetic nervous system // Neuroimmunomodulation. – 2010. – V. 17(5). – P. 298–304.

Shilov D.Ju.[1,2]

INTERACTION OF ADRENALIN AND HYDROCORTISONE IN REGULATION OF LYMPHOCYTE PROLIFERATIVE RESPONSE IN CULTURES WITH CONCANAVALIN A *IN VITRO*

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia; [2]Acad. E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, Russia, shilov-dj@mail.ru

Summary. Adrenaline hydrochloride (10^{-6} M) in cultures with 10 and 40 μg/ml concanavalin A (Con A) led to inhibition of lymphocyte proliferation. Suppressive effect of hydrocortisone (10^{-6} M) was more pronounced and was appeared at all concentrations of Con A. Synergism of the immunosuppressive action of adrenaline and hydrocortisone was observed in case of their combined addition into cultures with a concentration of Con A of 40 μg/ml. Antagonism of action of these compounds was revealed in cultures with a low levels of mitogen (2.5 and 5 μg/ml of Con A).

Key words: adrenaline, adrenoceptors, glucocorticoids, lymphocytes.

Таблица.

Влияние адреналина гидрохлорида, гидрокортизона на пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови практически здоровых людей в культурах с Кон А

Гормон	Культуры	Без митогена	Кон А, мкг/мл				
			2,5	5,0	10,0	20,0	40,0
Гидрокортизон, 10^{-6} М	с адреналином	3,3461±0,1113 (2218,6)	3,6603±0,1196 (4574,6)^b	3,7296±0,1056 (5365,7)^b	3,6008±0,1089 (3988,3)^{*a}	3,6467±0,1421 (4432,6)^{*a}	3,6788±0,2042 (4772,8)^{*ab}
	без адреналина	3,2773±0,1430 (1893,7)	3,3303±0,1497 (2139,6)^{*a}	3,3425±0,2345 (2200,4)^{*a}	3,6167±0,1680 (4136,7)^{*a}	3,8129±0,0667 (6499,1)^{*a}	4,0040±0,1250 (10091,7)*
Без гидрокортизона	с адреналином	3,2968±0,2057 (1980,5)	3,8335±0,1150 (6816,3)	3,8312±0,1198 (6779,9)	3,9628±0,0821 (9178,3)*	4,2289±0,0864 (16939,1)	4,2637±0,0634 (18351,2)*
	без адреналина (контроль)	3,4776±0,1011 (3003,3)	3,9111±0,0839 (8149,0)	3,9781±0,0718 (9507,2)	4,1960±0,0932 (15704,6)^a	4,2180±0,0776 (16520,5)	4,4970±0,0718 (31401,8)^a

Примечание. Число обследованных людей в контроле и опытных выборках равно 7. Приведены значения M ± m для показателей $\log_{10}$ имп/мин, в скобках - средние геометрические имп/мин (антилогарифм из M $\log_{10}$ имп/мин); * - $p<0,05$ по отношению к контролю по парному критерию Дункана; ^{a} - то же по отношению к адреналину; ^{b} - то же по отношению к гидрокортизону.

УДК 612.017.1:612.018: 615.357.631

Шилов С.Ю.[1]

ВЛИЯНИЕ ОРХИДЭКТОМИИ НА СТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ САМЦОВ КРЫС

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, stshilov@mail.ru

Резюме. У орхидэктомированных крыс в сравнении с некастрированными животными через 6 ч от начала стрессорного воздействия (иммобилизация в сочетании с кровопотерей) выявлено более выраженное снижение числа лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов, отсутствие увеличения числа нейтрофилов и повышение относительных показателей фагоцитарной активности нейтрофилов.

Ключевые слова: стресс, орхидэктомия, лейкоциты, нейтрофилы, фагоцитоз.

Введение

Известно, что половые стероиды способны модулировать реакции нейроэндокринной системы при стрессе [1], однако многие аспекты их участия в регуляции функций иммунной системы при стрессе изучены недостаточно. Ранее нами показано, что острый стресс у самцов крыс приводит к выраженному снижению реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при отсутствии изменения антителообразования, в то время как у неоперированных самок - к супрессии как антителопродукции, так и реакции ГЗТ. Эти изменения модифицируются при овариэктомии и орхидэктомии, введении эстрадиола или тестостерона [2, 3]. В частности, у орхидэктомированных крыс, в отличие от интактных самцов, стресс приводит к снижению выраженности не только реакции ГЗТ, но и антителообразования. Показана и более высокая резистентность самок в сравнении с самцами при травме и кровопотере, определяемая половыми стероидами [4].

Цель работы – исследование влияния орхидэктомии на стрессорные изменения количественного состава лейкоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови самцов крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены на 20 нелинейных белых крысах-самцах исходной массой 251±5 г. Операцию орхидэктомии выполняли под эфирным наркозом общепринятым методом за 1 месяц до начала эксперимента, крысы контрольной группы не подвергались операции. Острый стресс моделировали иммобилизацией в положении на спине в пластиковых фиксаторах в сочетании с дозированной кровопотерей (забор крови из сосудов хвоста до иммобилизации и через 6 ч от ее начала в объеме 1,5 мл). Исследовали количественный состав лейкоцитов периферической крови общепринятыми методами и фагоцитарную активность нейтрофилов. Контролем служили показатели исходного фона с образцами периферической крови, полученными до начала стрессорного воздействия. При оценке фагоцитоза в микропробирках с антиадгезивным покрытием смешивали 25 мкл гепаринизированной крови с 25 мкл суспензии формалинизированных эритроцитов барана (ФЭБ, $100x10^6$ клеток/мл), приготовленной на среде 199 с добавлением 10 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамина. Пробы инкубировали в течение 20 мин при 37^0С. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали микроскопически по ранее описанным показателям [5]. Статистический анализ результатов проводили с использованием парного и непарного вариантов *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что острый стресс у орхидэктомированных крыс приводит к более выраженному снижению числа лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов в периферической крови через 6 ч от начала стрессорного воздействия в сравнении с неоперированными крысами (таблица). В отличие от неоперированных самцов число нейтрофилов у орхидэктомированных животных через 6 ч от начала воздействия не отличается от исходного фона. Относительное число участвующих в фагоцитозе нейтрофилов у орхидэктомированных крыс через 6 ч в сравнении с исходным фоном повышается, а у неоперированных самцов не отличается от контроля. Абсолютные интегральные показатели нейтрофильного фагоцитоза через 6 ч в сравнении с исходным фоном повышаются в обеих группах животных, но механизм этих изменений у некастрированных крыс связан с увеличением общего числа нейтрофилов, в то время как у орхидэктомировнных самцов - с повышением относительных показателей фагоцитоза.

Заключение

Выявлено влияние орхидэктомии на выраженность стрессорных изменений количественного состава лейкоцитов периферической крови и показателей нейтрофильного фагоцитоза у крыс, проявляющееся в более выраженном снижении в условиях орхидэктомии числа лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов, отсутствии стрессорного увеличения числа нейтрофилов, а также в повышении относительных показателей нейтрофильного фагоцитоза через 6 ч от начала стрессорного воздействия.

Работа поддержана Программой Президиума РАН ""Молекулярная и клеточная биология".

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вундер П.А., Андронов Е.В., Андронова Т.А.* Стрессорные реакции и роль пола в их осуществлении // Успехи соврем. биол. – 1999. – Т. 119(4). – С. 335–344.

2. *Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., Шилов Д.Ю., Куделькина В.Г.* Половые различия стрессорных изменений иммунного ответа и влияние на них овариэктомии и эстрадиола // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2010. – № 2/1(29). – С. 235-236.

3. *Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., Ибрагимова Л.Р.* Влияние орхидэктомии и тестостерона пропионата на стрессорные изменения иммунного ответа у крыс // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/1(35). – С. 78–79.

4. *Choudhry M.A., Bland K.I., Chaudry I.H.* Trauma and immune response – effect of gender differences // Injure. – 2007. – V. 38(12). – P. 1382–1391.

5. *Shilov Ju.I., Orlova E.G.* Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response // Immunol. Lett. – 2003. – V. 86(3). – P. 229–233.

Таблица.

Влияние орхидэктомии на стрессорные изменения количественного состава лейкоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов крови крыс (M ± m)

Показатель	Неоперированные самцы		Орхидэктомированные самцы	
	исходный фон	острый стресс, 6 ч	исходный фон	острый стресс, 6 ч
Абс. число лимфоцитов	19312,8±1443,6	10901,5±1059,3*	16650,0±2130,5	6781,5±1108,3*#
Абс. число моноцитов	511,8±134,6	507,8±87,0	401,4±84,9	264,3±75,6#
Абс. число эозинофилов	752,3±168,2	552,2±144,1	398,9±77,9	208,0±48,9*#
Абс. число нейтрофилов	3903,0±685,1	6966,2±1007,6*	3145,8±453,9	3738,3±493,8#
Отн. число участвующих в фагоцитозе нейтрофилов, %	35,24±4,60	36,25±4,19	28,29±5,66	45,65±4,54*
Отн. число захваченных 1 нейтрофилом объектов	0,48±0,09	0,55±0,11	0,49±0,14	0,77±0,11
Абс. число захваченных нейтрофилами объектов	1859,74±448,12	3515,91±590,29*	1569,36±395,25	2577,93±406,89*
Абс. число участвующих в фагоцитозе нейтрофилов	1354,32±284,48	2395,69±335,84*	973,79±197,51	1617,02±237,69*

Примечание. Абсолютные показатели приведены в расчете на 1 мкл крови; * - p<0,05 по *t*-критерию Стьюдента для парных данных к исходному фону соответствующей группы; # - p<0,05 по *t*-критерию Стьюдента для непарных данных к неоперированным самцам крыс.

Shilov S. Ju.[1]

INFLUENCE OF ORCHIDECTOMY ON STRESS-INDUCED CHANGES OF LEUKOCYTE COUNT AND NEUTROPHIL PHAGOCYTIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD OF MALE RATS

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia, stshilov@mail.ru

Summary. A more pronounced decrease in the number of lymphocytes, monocytes and eosinophils, the absence of increase in the number of neutrophils and increase in relative parameters of the neutrophil phagocytic activity after 6 h from the start of the stress exposure (immobilization in combination with blood loss) were revealed in orchidectomized rats in comparison with intact animals.

Key words: stress, orchidectomy, leukocytes, neutrophils, phagocytosis

УДК 612.018:612.017

Ширшев С.В., Орлова Е.Г.

РЕГУЛЯЦИЯ ЛЕПТИНОМ И ГРЕЛИНОМ АКТИВНОСТИ ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ МОНОЦИТОВ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, orlova_katy@mail.ru

Резюме. Исследованы эффекты лептина и грелина в концентрациях, характерных для беременности, на активность индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) моноцитов периферической крови в системе *in vitro*. Установлено, что лептин усиливал, а грелин не влиял на ЛПС-индуцированную активность IDO моноцитов. При сочетанном внесении лептина и грелина выявлено усиление ЛПС-индуцированной активности IDO моноцитов. Таким образом, лептин является важным регулятором активности IDO моноцитов.

Ключевые слова: лептин, грелин, индоламин-2,3-диоксигеназа, моноциты.

Введение

Согласно современным представлениям одним из наиболее значимых механизмом формирования иммунологической толерантности является усиление активности фермента IDO как при контакте с Т-регуляторными клетками (Treg), так и под действием других стимулов [1]. IDO, экспрессируемый в антиген-презентирующих клетках (дендритных клетках, макрофагах, а также моноцитах), катаболизирует триптофан, что приводит к гибели цитотоксических лимфоцитов вследствие дефицита необходимой для их активности аминокислоты и выделения токсичных продуктов ее деградации, как кинуренин [1]. Пептидные гормоны лептин и грелин играют важную роль в регуляции репродуктивных процессов и иммунных реакций при беременности, а дисбаланс этих гормонов сопряжен с дефектами репродуктивной функции вследствие срыва иммунологической толерантности [2]. Поэтому изучение роли лептина и грелина в индукции активности IDO весьма актуально. Цель работы – изучить влияние лептина и грелина, а также их совместные эффекты в концентрациях, отражающих уровень гормонов в периферической крови при беременности, на активность IDO моноцитов в системе *in vitro*.

Суспензию мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографина. МПК культивировали с гормонами в течение 4 часов в присутствии липополисахарида (ЛПС, 100 нг/мл, “Sigma”, США) или интерферона-гамма (INF-γ, 10 нг/мл, «Вектор Бест», Россия) в среде, содержащей триптофан. Лептин (“Sigma”, США) в культуры вносили в концентрациях 10 и 35 нг/мл, отражающих его содержание в периферической крови в I и во II-III триместрах беременности соответственно [3]. Грелин (“Sigma”, Израиль) использовали в концентрациях 1,25 и 0,83 нг/мл, соответствующих уровню гормона в периферической крови в I-II и III триместрах беременности [4]. Для изучения совместных эффектов лептин и грелин вносили в культуры одномоментно в сочетаниях, характерных для I-II (лептин 10 нг/мл + грелин 1,2 нг/мл) и II-III (лептин 35 нг/мл + грелин 0,87 нг/мл) триместров беременности. В контрольные пробы вместо гормонов добавляли равное количество их растворителя (изотонического хлорида натрия). Активность IDO в МПК определяли спектрофотометрически по изменению концентрации кинуренина [5].

Результаты и обсуждение

Установлено, что лептин в концентрации, характерной для II-III триместров беременности, усиливал, а грелин в исследуемых дозах не влиял на ЛПС-индуцированную активность IDO моноцитов. На фоне активации моноцитов INF-γ, значимых эффектов гормонов не выявлено (таблица). При совместном внесении лептина и грелина в дозах, характерных для второй половины беременности, выявлено увеличение ЛПС-индуцированной активности IDO моноцитов. Таким образом, можно полагать, что лептин в концентрации, сопоставимой с его уровнем во второй половине беременности, является значимым регулятором активности IDO моноцитов. Поскольку активирующий эффект лептина проявляется только совместно с ЛПС, можно предположить, что гормон усиливает, в основном, NF- B-зависимый (ядерный фактор κB) путь активации IDO моноцитов. Учитывая, что повышение активности IDO связано с увеличением количества Treg, можно полагать, что активация лептином IDO моноцитов способствует формированию периферической толерантности при беременности.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Miwa N., Hayakawa S., Miyazaki S., Myojo S., Sasaki Y., Sakai M., Takikawa O., Saito S.* IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion //Mol. Hum. Reprod. – 2005. – V. 11. – P. 865-870.

2. *Tena-Sempere M.* Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function // Neuroendocrinology. – 2007. – V. 86. – P. 229–241.

3. *Hardie L., Trayhurn P., Abramovich D.* Circulating leptin in women: longitudinal study in menstrual cycle and during pregnancy //Clin. Endocrinol. – 1997. – V. 47. – P. 101–106.

4. *Fuglsang J., Skjжrbжk C., Espelund U., Frystyk J.* Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy // Clin. Endocrinol. – 2005. – V. 62. – P. 554–559.

5. *Braun D., Longman R.S., Albert M.L.* A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation // Blood. – 2005. – V. 106. – P.2375–2381.

Таблица.

Влияние лептина и грелина на активность IDO моноцитов периферической крови

Гормональное воздействие	n	Концентрация кинуренина, мкМ	
		Стимулятор ЛПС	Стимулятор INF-γ
Контроль	8	1,97±0,58	2,03±0,54
Лептин – 10 нг/мл	8	2,81±0,78	2,91±0,23
Лептин – 35 нг/мл	8	6,06±2,22*	2,04±0,37
Грелин – 1,2 нг/мл	8	4,97±1,53	3,43±0,36
Грелин – 0,87 нг/мл	8	4,64±1,58	2,73±0,44
Лептин 10 нг/мл +Грелин 1,2 нг/мл	8	5,11±1,38	3,10±0,46
Лептин 35 нг/мл +Грелин 0,87 нг/мл	8	6,13±1,31*	3,03±0,54

Примечание. *$p<0,05$ по парному *t*-критерию Стьюдента по отношению к контролю.

Shirshev S.V., Orlova E.G.

LEPTIN AND GHRELIN REGULATION OF INDOLEAMINE 2,3 DIOXYGENASE ACTIVITY IN MONOCYTES

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, orlova_katy@mail.ru

Summary. The effects of leptin and ghrelin and also their combinations at doses characteristic for different trimesters of pregnancy on the induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity in monocytes are investigated *in vitro*. It is shown that leptin increase, but ghrelin has no influence on LPS-induced IDO activity in monocytes. At the simultaneous introduction of leptin and ghrelin the increasing of LPS-induced IDO activity in monocytes is shown. Thus, during the pregnancy leptin is the important regulator of IDO activity in monocytes.

Key words: leptin, ghrelin, indoleamine 2,3 dioxygenase, monocytes.

УДК 502.6:631.6:576.8

Амирова А.Р., Григориади А.С., Киреева Н.А.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ ДЛЯ РЕКУЛЬТИВАЦИИ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЕШЛАМОМ, ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Башкирский государственный университет”, г. Уфа, Россия, aliika2007@yandex.ru

Резюме. Оценена эффективность применения технологии биоремедиации путем стимуляции аборигенной микробиоты с использованием органоминерального удобрения Бионекс-Плюс. Показано, что внесение удобрения в почву, загрязненную нефтешламом, способствует росту численности углеводородокисляющей микробиоты, стимуляции активность почвенной липазы и снижению содержания остаточных углеводородов.

Ключевые слова: нефтешлам, серая лесная почва, Бионекс-Плюс, биорекультивация, биологическая активность почвы.

Введение

Нефтедобывающие и нефтеперерабатывающие предприятия являются одними из основных источников промышленного загрязнения на территории Башкирии. Особо негативное влияние на почвы оказывают отходы нефтяной промышленности, которые чрезвычайно разнообразны по составу. Это, в свою очередь, приводит к сложностям, связанным с их трансформацией в природных условиях. В настоящее время активно разрабатываются меры по их утилизации, и приоритет отдается биологическим методам обезвреживания и восстановления почвы.

В данной работе представлены результаты исследования влияния биоудобрения Бионекс-Плюс на восстановление биологических свойств почвы, загрязненной жидким нефтешламом.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на образцах серой лесной почвы, загрязненной нефтешламом в концентрациях 1-15% масс. Удобрение Бионекс-Плюс предназначено для регенерации плодородия земель, загрязненных продуктами техногенного происхождения, улучшения структуры почвы и комплексного питания растений органическими и минеральными веществами. Бионекс получают ферментированием куриного помета с добавлением органических наполнителей (опилок, соломы, торфа и др.) (ТУ 2387-010-20672718-01). Учет численности микроорганизмов проводили через 3, 30, 60, 90 и 180 сут с момента загрязнения по общепринятой методике посева почвенной суспензии на соответствующие питательные среды. Ферментативная активность определялась титрометрическим методом [1], остаточные углеводороды в почве – весовым методом [2].

Результаты и обсуждение

Было показано, что применение Бионекса способствовало снижению содержания остаточных нефтепродуктов. Полученные данные согласуются с результатами, полученными при оценке микробиологической активности почвы, представленными выше. В вариантах с меньшими стартовыми концентрациями нефтешлама снижение содержания нефтяных углеводородов было менее заметным. Однако снижение содержания поллютанта через 180 сут составило 60% при начальном загрязнении 5% и 40%. – при 15%-ном загрязнении соответственно.

Изменения микробиологических параметров почвы при нефтяном загрязнении могут рассматриваться как значимые экологические нарушения. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в почве отражает их способность участвовать в разложении органического вещества и круговороте минеральных веществ. Так, в фоновой почве численность УОМ оставалась относительно стабильной в течение всего экспериментального периода. В концентрациях до 5% нефтешлам являлся субстратом для микроорганизмов и вызывал увеличение их численности. Нефтяные углеводороды в более высоких концентрациях выступали как комплексный ингибитор биологической активности почвы. Внесение Бионекса способствовало увеличению численности УОМ. При незначительном загрязнении достоверных отличий между загрязненными и обработанными пробами почвы не отмечалось. Максимальный рост численности данной группы микроорганизмов был зарегистрирован при первоначальном содержании углеводородов 5%. Однако наиболее значительный положительный эффект от обработки удобрением обнаруживался при 15%-ной степени загрязнения (рисунок).

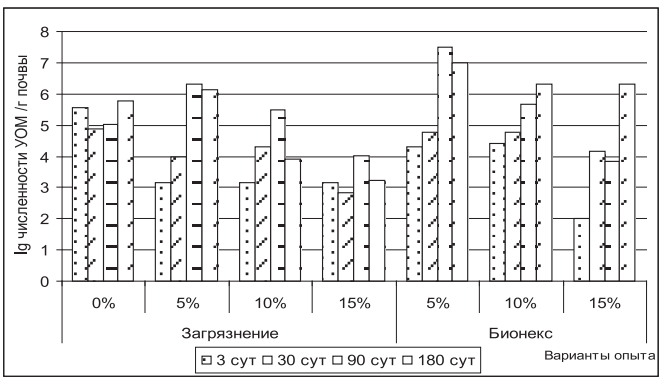


Рисунок. Изменение численности УОМ в серой лесной почве при загрязнении нефтешламом (lg числа жизнеспособных клеток).

Среди показателей для оценки экологического состояния почв значительная роль принадлежит энзиматической активности, тесно связанной с развитием микроорганизмов-продуцентов этих ферментов. По мнению Р. Маргезина с соавт. [3], для деградации липидов используются ферментные системы, очень похожие на системы биодеградации нефти. В данной работе активность почвенной липазы была использована в качестве индикатора биодеградации нефтяных углеводородов в почвах. Через 3 сут после загрязнения почв нефтью отмечено ингибирование активности липазы при всех концентрациях загрязнителя в сравнении с контрольным вариантом опыта. В течение последующих 60 сут загрязнение нефтешламом оказывало стимулирующий эффект, а через 90 сут вновь происходило сильное снижение активности фермента. Использование для рекультивации органоминерального удобрения уже в первый месяц способствовало увеличению активности почвенной липазы по сравнению с началом эксперимента. Липолитическая активность была выше, чем в необработанных образцах при всех концентрациях загрязнителя в почве на протяжении шести месяцев, а затем снижалась до фоновых значений.

Заключение

Таким образом, технологию использования Бионекс-Плюс можно отнести к методам ремедиации, основанным на стимулировании аборигенной микробиоты. В результате использования удобрения отмечался рост численности углеводородокисляющей микробиоты, стимуляция ферментативной активности почвы и снижение содержания остаточных нефтепродуктов. Исследуемые показатели свидетельствуют о снижении токсического действия нефтешлама и постепенного восстановления почвенной экосистемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Хазиев Ф.Х.* Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252 с.

2. *Mc Gill W.W., Rowell M.J.* Determination of oil content of oil contaminated soil // Sci. Tot. Environ. – 1980. – V. 14(3). – P. 245–253.

3. *Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F.* Monitoring of bioremediation by soil biological activities // Biotechnology Techniques. – 1999. – V. 3. – P. 859–863.

Amirova A.R., Grigoriadi A.S., Kireeva N.A.

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF USE OF ORGANIC FERTILIZER OF SOILS POLLUTED BY OIL SLUDGE ON MICROBIOLOGICAL INDICATORS

Bashkir State University, Ufa, Russia, aliika2007@yandex.ru

Summary. Results of an estimation of efficiency of application of technology of bioremediation by stimulation native microorganisms using organic-fertilizer Bioneks-plus are presented. It has been shown that the number of hydrocarbon oxidizing microorganism and activity of a soil lipase were increased; and residual petroleum hydrocarbons were decreased after treatment of soil polluted by oil sludge.

Key words: oil sludge, gray forest soil, Bioneks Plus, bioremediation, biological activity of soil.

УДК 504.054–574.3

Антипина А.И., Кормильцева И.П., Яковлева Г.Ю., Захарова Н.Г., Куриненко Б.М.

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА НА МИКРОМИЦЕТЫ РОДОВ *FUSARIUM* И *PENICILLIUM*

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, г. Казань, Россия, Yakovleva_Galina@mail.ru

Резюме. Исследовали способность микромицетов родов *Fusarium* и *Penicillium* расти в жидких и на твердых (агаризованных) средах в присутствии 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) различных концентраций (от 20 до 200 мг/л). Токсический эффект ксенобиотика проявлялся сильнее в жидких средах. ТНТ в концентрации выше 50 мг/л (для *Penicillium* sp.) и 100 мг/л (для *Fusarium* sp.) оказывал подавляющее воздействие на рост микромицетов. Отсутствие роста колоний *Penicillium* sp. и *Fusarium* sp. отмечалось при концентрации ксенобиотика 100 и 200 мг/л соответственно. Оба штамма оказались способны трансформировать ТНТ по восстановительному пути.

Ключевые слова: 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), токсичность, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp.

Введение

В последние десятилетия большое внимание уделяется использованию грибов в биоремедиции почв, загрязненных 2,4,6-тринитротолуолом (ТНТ, тротил) – трудноразлагаемым высокотоксичным веществом [1]. Ранее было показано, что при загрязнении выщелоченного чернозема ТНТ (200 мг/кг) качественный состав сообщества микромицетов становился беднее по сравнению с таковым почвы контрольного варианта. Однако при этом возрастала частота встречаемости родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Sporotrichum* и др., содержащих фитопатогенные, сапротрофные и условно патогенные для человека микромицеты, имеющие обильное спороношение [2]. Цель настоящей работы – оценка чувствительности к ТНТ микромицетов родов *Fusarium* и *Penicillium*, выделенных из загрязненного ксенобиотиком (200 мг/кг) чернозема выщелоченного.

Материалы и методы исследования

Культивирование проводили при 28^{0}С в жидкой и на твердой (агаризованной) среде Чапека. ТНТ в концентрации 20-200 мг/л вносили в среду до автоклавирования.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы была оценена способность выбранных микромицетов расти в присутствии различных концентраций ТНТ. Штамм, принадлежащий к *Penicillium* sp., оказался способным расти в жидких средах лишь при концентрации ТНТ 20 мг/л. При увеличении концентрации ксенобиотика наблюдался незначительный прирост биомассы. При выращивании штамма, принадлежащего к *Penicillium* sp., на агаризованной среде с различными концентрациями тротила также наблюдалось ингибирование роста культуры. Однако в отличие от жидких сред рост микромицета отмечался при концентрации 50 мг/л. При концентрации выше 100 мг/л образование колоний полностью отсутствовало. Штамм *Fusarium* sp. оказался способным расти в жидкой среде и при концентрации ТНТ 50 мг/л. На 7 сут культивирования концентрация биомассы составляла 38 и 61% от контрольного (без ТНТ) варианта при росте культур *Penicillium* sp. и *Fusarium* sp. соответственно. Концентрации выше 100 мг/л подавляли рост микромицета *Fusarium* sp. При выращивании штамма *Fusarium* sp. на твердых питательных средах в присутствии 200 мг/л ТНТ регистрировали полное подавление роста колоний.

Для оценки токсического действия ксенобиотика в отношении микромицетов использовали два показателя: ED_{50} (показатель концентрации вещества, необходимый для подавления 50% роста грибов) и ED_{95} (показатель концентрации вещества, необходимой для практически полного подавления роста). Концентрация ТНТ, вызывающая подавление 50% роста обоих микромицетов на твердых средах, достоверно не отличалась и составляла в среднем 42 мг/л. В жидких средах такой закономерности не наблюдалось. Концентрация ТНТ, вызывающая подавление 50% роста культуры *Fusarium* sp., в 2 раза превышала таковую для культуры *Penicillium* sp. и составляла 75 мг/л. ED_{95} определяли только на твердых средах. При этом установлено подавление 95% роста колоний *Fusarium* sp. при концентрации ТНТ 188 мг/л и колоний *Penicillium* sp. при концентрации 98 мг/л.

При оценке способности микромицетов трансформировать ТНТ показано, что оба штамма способны трансформировать ксенобиотик во всех использованных концентрациях. ТНТ в концентрации 20 и 50 мг/л трансформировался полностью (штамм *Fusarium* sp. элиминировал ТНТ в данных концентрациях в течение 4 сут, штамм *Penicillium* sp. – в течение 7 сут). Следовательно, рост микромицетов, наблюдаемый в присутствии низких концентраций ксенобиотика, отмечался лишь после элиминации ТНТ из среды культивирования. ТНТ в концентрации 100, 150 и 200 мг/л трансформировался клетками *Penicillium* sp. на 7 сут культивирования на 68, 27 и 18% соответственно, а *Fusarium* sp. – на 74, 34 и 22% соответственно. Данные, полученные методом ВЭЖХ, показали, что при всех концентрациях ксенобиотика процесс трансформации шел по восстановительному пути, с образованием гидроксиламинов (ГА) и моноаминопроизводных (2А и 4А). В качестве основного метаболита в среде культивирования накапливался 4-амино-2,6-динитротолуол.

Следовательно, штамм *Fusarium* sp. оказался менее чувствительным к токсическому действию ксенобиотика по сравнению со штаммом *Penicillium* sp. при росте как на твердых, так и в жидких средах. Несмотря на то, что исследуемые микромицеты были выделены из загрязненной ТНТ (200 мг/кг) почвы, ксенобиотик в данной концентрации полностью подавлял их рост в жидких средах. Этот факт объясняется тем, что часть внесенного тротила сорбировалась на почвенных частицах, и концентрация доступного (водорастворимого) ТНТ уже через 6 ч составляла лишь 16% от начальной концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Esteve-Nunez A., Caballero A., Ramos J.L.* Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene // Microbiol. Molecular Biology Reviews. – 2001. – P. 335–352.

2. *Кормильцева И.П., Яковлева Г.Ю., Захарова Н.Г., Куриненко Б.М.* Структура сообщества микромицетов чернозема выщелоченного при загрязнении 2,4,6-тринитротолуолом // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Т. 153 (кн. 1). – С. 161–167.

Antipina A.I., Kormiltseva I.P., Yakovleva G.Yu., Zakharova N.G., Kurinenko B.M.

ESTIMATION OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE TOXIC ACTION ON MICROMYCETES OF THE GENERA *FUSARIUM* AND *PENICILLIUM*

Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Russia,

Yakovleva_Galina@mail.ru

Summary. The ability of micromycetes of the genera *Fusarium* and *Penicillium* to grow in the presence of various concentrations of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) (20-200 mg/l) in liquid and solid (agar)

media was investigated. The toxic effect of this xenobiotic was stronger on liquid media. The concentrations of TNT above 50 mg/l (for *Penicillium* sp.) and 100 mg/l (for *Fusarium* sp.) completely suppressed the growth of micromycetes. The absence of growth of *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. colonies was observed at xenobiotic concentrations of 100 and 200 mg/l, respectively. Both strains appeared to be able to transform TNT via a regenerative way.

Key words: 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), toxicity, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp.

УДК 631.46:628.3

Ахметзянова Л.Г., Селивановская С.Ю.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ РЕКУЛЬТИВАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, г. Казань, Россия, Leisan-ksu@mail.ru

Резюме. В лабораторных условиях проведена рекультивация серой лесной почвы, загрязненной товарной нефтью в различных концентрациях, с использованием методов биоаугментации и биостимуляции. Показано, что наилучшее снижение содержания нефтепродуктов в почве происходило в вариантах с применением перегноя в качестве ремедианта. При этом деградация углеводородов нефти сопровождалась увеличением уровня общей микробной биомассы и респираторной активности.

Ключевые слова: нефть, почва, биологическая активность почв, рекультивация.

Введение

В технологиях очистки почвы от нефтяного загрязнения активно развиваются направления, использующие биологические методы. При биологической рекультивации происходит преобразование токсичных веществ в менее или нетоксичные, при этом применение неразрушающих методов исключает неоправданное изменение экосистем [1, 2].

Материалы и методы исследования

В данной работе проведено лабораторное моделирование загрязнения серой лесной почвы, отобранной в фоновых районах Республики Татарстан, товарной нефтью в концентрациях 1, 2, 3, 10, 15% от массы почвы. В качестве приемов рекультивации использовали различные способы рекультивации, относящиеся к методам биостимуляции: рыхление (варианты Р), внесение минерального азотного удобрения (мочевина) с опилками (варианты М), органического удобрения в виде перегноя (варианты П), и биоаугментации: коммерческого препарата “Деворойл” (варианты Д). В течение семи месяцев с момента загрязнения определяли динамику изменения уровня общей микробной биомассы, численности гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий, респираторной и ферментативной активности почвенного микробного сообщества серой лесной почвы при различных дозах загрязнения и способах рекультивации. Параллельно с этим было проведено определение остаточного содержания нефтепродуктов в почве методом ИК-спектрометрии.

Результаты и обсуждение

Показано, что в интервале исследуемых доз примененные методы рекультивации нефтяного загрязнения вызывают интенсификацию респираторной и ферментативной активности почвенного микробного сообщества, увеличение численности углеводородокисляющих и гетеротрофных микроорганизмов по сравнению с незагрязненной почвой.

Анализ экспериментальных данных показал различие скорости деградации нефтепродуктов в вариантах с разной степенью загрязнения и применяемыми методами рекультивации почв (рисунок).

Установлено, что применение рыхления и внесение мочевины с опилками оказывало такой же эффект в отношении деструкции нефти, как и применение коммерческого препарата “Деворойл”. Например, в вариантах с 3% загрязнением снижение содержания нефтепродуктов к концу эксперимента составило 79,8, 75,2 и 73,9% для вариантов 3Р, 3М и 3Д соответственно. К более заметному снижению содержания нефтепродуктов привело применение в качестве ремедианта перегноя, которое привело к деструкции до 90% внесенных углеводородов. При этом именно для вариантов с применением перегноя отмечали наиболее высокие значения почвенной микробной биомассы и респираторной активности, свидетельствовавшие об активной минерализации органического вещества. Полученные результаты подтверждаются литературными данными о благоприятном влиянии на биоремедиацию нефтезагрязненных почв внесения легкодоступного углерода [3, 4].

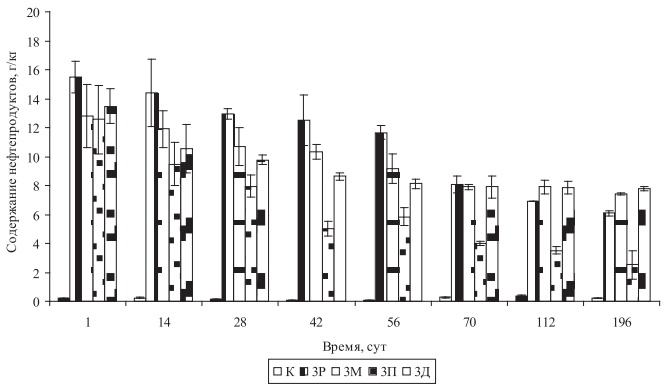


Рисунок. Изменение содержания нефтепродуктов при 3% загрязнении серой лесной почвы при разных способах рекультивации.

Заключение

Таким образом, из двух основных направлений биоремедиации нефтезагрязненных почв (биостимуляция и биоаугментация) в нашем случае предпочтительным оказалась биостимуляция.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00263-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Margesin R., Schinner F.* Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – № 67. – P. 3127-3133.

2. *Greenwood P.F., Wibrow S., George S.J., Tibbett M.* Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure // Organic Geochemistry. – 2009. – № 40. – P. 293–300.

3. *Namkoong W., Hwang E., Park J., Choi J.* Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting // Environmental Pollution. – 2002. – № 119. – P. 23-31.

4. *Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S.* Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation // Environmental Pollution. – 2005. – № 136. – P. 187-195.

Akhmetzyanova L.G., Selivanovskaya S.Y.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF OIL POLLUTED SOIL RECULTIVATED USING DIFFERENT METHODS

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia, Leisan-ksu@mail.ru

Summary. Recultivation of crude oil polluted grey soil using bioaugmentation and biostimulation methods was conducted. Best decreasing rate of hydrocarbon content was revealed in manure applied samples. Herewith, degradation of hydrocarbons was accompanied by increasing of microbial biomass and soil respiration activity.

Key words: oil, soil, biological activity, remediation.

УДК 615.322+470.53

Власов А.С., Белоногова В.Д., Курицын А.В.

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ И ХИМИЧЕСКАЯ ТАКСАЦИЯ ЗАРОСЛЕЙ ДИКОРАСТУЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная фармацевтическая академия” Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пермь, Россия, belonogova@pfa.ru

Резюме. Проведены исследования по оценке экологической чистоты и химическая таксация зарослей дикорастущих лекарственных растений Пермского края. Выявлены заросли дикорастущих лекарственных растений с высоким содержанием биологически активных веществ, проведена их оценка на экологическую безопасность.

Ключевые слова: лекарственные растения, лекарственное растительное сырье, биологически активные вещества, ресурсно-сырьевой потенциал, экологическая чистота.

Пермский край – один из наиболее перспективных регионов России по уровню ресурсно-сырьевого потенциала, включая дикорастущие лекарственные растения. Однако систематические исследования по экологической безопасности и чистоте зарослей дикорастущих лекарственных растений отсутствуют [1]. Для эффективного использования ресурсно-сырьевого потенциала природных популяций важна количественная оценка содержащихся в них биологически активных веществ (БАВ), экстрактивных веществ и других товароведческих показателей. Конечным этапом работы следует считать оценку качества сырья, позволяющую дать окончательное заключение о возможности его дальнейшей реализации [2].

Объектами исследования служили дикорастущие лекарственные растения (ЛР), произрастающие во всех растительных подзонах Пермского края, лекарственное растительное сырье (ЛРС) с которых было собрано в различных эколого-фитоценотических условиях, в местах, удаленных от дорог (не менее 100 м) и крупных промышленных предприятий. Проведен анализ 248 образцов ЛРС (багульника болотного – 8, душицы обыкновенной – 55, зверобоев продырявленного и пятнистого – 35, крапивы двудомной – 7, мать-и-мачехи обыкновенной – 11, можжевельника обыкновенного – 14, пижмы обыкновенной – 4, полыни горькой – 39, пустырника пятилопастного – 15, тысячелистника обыкновенного – 60). Проведена статистическая обработка результатов фитохимического анализа, определены показатели среднего содержания БАВ в сырье, на основании которых осуществлена химическая таксация зарослей с целью выявления зарослей с высоким содержанием БАВ [3].

Анализ побегов багульника болотного. Установлено, что содержание влаги, золы общей не превышало допустимых пределов по нормативному документу (НД). Радиационный фон находился в пределах от 8,36±0,93 до 9,69±0,45 и не превышал общего радиационного фона Пермского края. Содержание эфирного масла соответствовало требованиям фармакопейной статьи на сырье и составляло от 0,22 до 0,36%. В результате анализа количественной оценки БАВ сырья была выявлена химическая неоднородность зарослей. Среднее содержание эфирного масла составляло 0,27%. Анализ проведенных исследований по химической таксации зарослей багульника болотного показал, что заготовка сырья с высоким содержанием БАВ возможна в Карагайском и Нытвенском районах, площадь заготовок –115,0 га.

Анализ травы душицы. Содержание влаги и тяжелых металлов соответствовало требованиям НД. Содержание золы общей в образцах, заготовленных в Еловском, Уинском, Чернушинском районах, превышало допустимые пределы, и заготовка сырья в данных местообитаниях не рекомендована. Радиационный фон находился в пределах от 10,1±0,93 до 11,6±1,10 и не превышал общего радиационного фона Пермского края. Содержание эфирного масла соответствовало требованиям фармакопейной статьи на сырье и составляло от 0,11 до 0,44%. Фитохимический анализ травы душицы позволил установить химическую неоднородность зарослей и выделить локальные популяции с высоким содержанием БАВ в Ильинском, Карагайском и Березовском районах. Содержание БАВ в данных районах составляло от 0,31 до 0,44%. Среднее содержание эфирного масла в траве душицы обыкновенной – 0,28 ±0,03. Локальные популяции душицы обыкновенной с высоким содержанием (выше среднего) БАВ были обнаружены в Ильинском, Карагайском и Березовском районах.

Анализ травы зверобоя. В результате проведенного анализа установлено, что содержание влаги, золы и тяжелых металлов соответствовало требованиям НД. Радиационный фон находился в пределах от 7,52±0,34 до 8,90±0,92 и не превышал общего радиационного фона Пермского края. Химическая таксация зарослей по содержанию суммы флавоноидов обнаруживала колебания от 3,99±0,06 до 6,69±0,16%. В среднем, содержание суммы флавоноидов составляло 5,43±0,23%. Отдельные локальные популяции с высоким содержанием БАВ выявлены в Октябрьском, Бардымском, Осинском и Уинском районах.

Анализ листьев крапивы. В образцах сырья крапивы из числовых показателей только содержание влаги соответствовало требованиям НД. Завышенное содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, было обнаружено в образцах, заготовленных в Бардымском, Осинском и Кунгурском районах. Завышенное содержание тяжелых металлов – в образце, отобранном из Осинского района. Заготовка сырья крапивы в данных местах обитания не рекомендована.

Анализ листьев мать-и-мачехи. Не все образцы по исследованным показателям соответствовали требованиям НД. Завышенное содержание тяжелых металлов обнаружено в образцах из Бардымского и Осинского районов; завышенное содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, обнаружено в образцах из Осинского и Кунгурского районов. Заготовка сырья из данных мест произрастания не рекомендована.

Анализ плодов можжевельника. Анализ сырья показал, что радиационный фон находился в пределах от 7,52±0,34 до 8,90±0,92 и не превышал общего радиационного фона Пермского края. Содержание эфирного масла соответствовало требованиям фармакопейной статьи на сырье и составляло от 0,55% до 0,79%. Среднее содержание эфирного масла – 0,63±0,03%. По данным химической таксации зарослей можжевельника обыкновенного были выделены отдельные локальные популяции с высоким содержанием БАВ в Большесосновском и Карагайском районах. Содержание БАВ в данных районах – от 0,76 до 0,79%.

Анализ цветков пижмы. Результаты анализа показали, что не все образцы сырья соответствовали требованиям НД. Завышенное содержание золы общей было обнаружено в образцах из Бардымского и Осинского районов. Заготовка сырья из данных мест произрастания не рекомендована. Содержание тяжелых металлов во всех образцах сырья соответствовало требованиям ГФ XI. Результаты определения радиационного фона в Осинском районе показали, что доза гамма-фона не превышала общий радиационный фон, установленный для Пермского края.

Анализ травы полыни горькой. Установлено, что все показатели соответствовали требованиям ГФ XI издания (статья 44). Содержание экстрактивных веществ составляло от 20,88±0,95 до 36,05±0,92%. Среднее значение суммы экстрактивных веществ – 28,27±1,73%. По данным химической таксации исследованных образцов были выявлены заросли с повышенным содержанием БАВ в Бардымском, Березовском, Кунгурском, Карагайском и Осинском районах.

*Анализ травы пустырника***.** В результате анализа установлено, что содержание суммы экстрактивных веществ во всех образцах сырья соответствовало требованиям статьи 54 ГФ XI издания. Содержание суммы экстрактивных веществ составляло от 22,79±0,71 до 36,89±1,25%. Среднее значение суммы экстрактивных веществ – 29,4±1,9%. По данным химической таксации зарослей были выявлены таковые с высоким содержанием БАВ в Бардымском, Березовском, Кунгурском районах.

Анализ травы тысячелистника. Анализ показал, что образец, отобранный на территории Уинского района, по показателю содержания золы общей и нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не соответствовал требованиям ГФ XI издания. Химическая таксация зарослей тысячелистника обыкновенного показала, что содержание эфирного масла в образцах сырья варьировала в диапазоне от 0,12 до 0,25%. Среднее значение содержания эфирного масла в траве тысячелистника составляло 0,18±0,01%. В результате проведенного фитохимического анализ была установлена химическая неоднородность зарослей, и выделены отдельные ло-

кальные популяции с высоким содержанием БАВ в Ильинском, Карагайском, Бардымском, Березовском, Кунгурском, Октябрьском, Осинском, Уинском и Чернушинском районах.

Полученные сведения о местах произрастания, качестве и запасах сырья дикорастущих ЛР позволят создать научно-обоснованную систему их заготовки с учетом своевременного воспроизводства и охраны. По результатам проведенного исследования экологической безопасности ЛРС, заготовку листьев крапивы в Осинском районе, листьев мать-и-мачехи в Бардымском и Осинском районах проводить не рекомендуется из-за завышенного содержания тяжелых металлов. Для экологически чистых зарослей ЛР составлены рекомендации по их рациональной эксплуатации. При определении удельного радиационного фона в ЛРС исследуемых районов выявлено, что доза гамма-фона не превышала норм, установленных для Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоногова В.Д.* Ресурсы, экологическая безопасность и фитохимические исследования дикорастущих лекарственных растений Пермского края: автореф. дис…. док. фармац. Наук. – Пермь, 2009. – 39 с.

2. *Курицын А.В., Белоногова В.Д., Олешко Г.И.* Проблемы экологической чистоты лекарственного растительного сырья Пермского края // Фармация. – 2007. – № 3. – С. 11–13.

3. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

Vlasov A.S., Belonogova V.D., Kuritsyn A.V.

ESTIMATION OF ECOLOGICAL SAFETY AND CHEMICAL TAXATION OF THICKETS OF WILD-GROWING MEDICINAL PLANTS OF PERM REGION

Perm State Pharmaceutical Academy, Russia, Perm,

belonogova@pfa.ru

Summary. Studies on ecological cleanliness and chemical taxation of wild-growing medicinal plants thickets of Perm region were conducted. Wild-growing medicinal plants with high contents of biologically active compounds were revealed; ecological safety of these thickets was estimated.

Key words: medicinal plants, raw medicinal plants, biologically active compounds, raw material resource potential, ecological safety.

УДК 631.445:665.6

Волченко Н.Н., Алёшина Н.Ю., Павлов В.В.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЁННОЙ НЕФТЬЮ, ПРИ ИНТРОДУКЦИИ РОДОКОККАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ УГЛЕВОДОРОДОВ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

“Кубанский государственный университет”, г. Краснодар, Россия, volchenko.n@mail.ru

Резюме. Обработка нефтезагрязненной почвы бактериями-нефтедеструкторами рода *Rhodococcus* повышает её микробиологическую активность. При внесении 10^7 КОЕ/г штаммы-интродуценты успешно удерживаются в составе микробного ценоза. Более эффективны в долговременном плане гидрофобные штаммы R-форм. Биоаугментация почвы родококками снижает её фитотоксичность.

Ключевые слова: родококки-деструкторы углеводородов, биоаугментация, фитотоксичность.

Введение

Загрязнение природных сред техногенными поллютантами, в том числе нефтепродуктами, является одной из острейших проблем, ставящих под угрозу здоровье населения. Биологический способ ликвидации загрязнений является самым экологичным, не создающим вторичных отходов, без использования агрессивных реагентов. Целью работы являлась оценка в лабораторном эксперименте влияния биоаугментации штаммами-нефтедеструкторами почвы, загрязненной нефтью, на процессы её ремедицации.

Материалы и методы исследования

В работе использовали чернозём – типичный для Кубани тип почвы, наиболее часто выступающий объектом ремедиации на Юге России. Почву вносили в сосуды в количестве 0,2 кг, сырую нефть марки “Западно-Сибирская” вносили в концентрации 50 г/кг, азотно-фосфорные соединения в форме удобрения “нитроаммофоска”. В качестве интродуцентов применяли 4 штамма из коллекции нефтеокисляющих бактерий кафедры генетики, микробиологии и биотехнологии КубГУ – *Rhodococcus erythropolis* F1, *Rhodococcus* sp. F5, *Rhodococcus* sp. J8 и *Rhodococcus* sp. B8. Штаммы F1 и F5 относятся к S-формам (показатель гидрофобности клеток соответственно 24 и 6%) , J8 и B8 – к R-формам (88 и 42% соответственно). Последние два штамма при росте на питательном агаре обладают характерными окрашенными колониями, фенотипически отличимыми от типичной микрофлоры, используемой в опыте почвы. Родококки вносили в виде водных суспензий в двух вариантах – в концентраций 10^5 или 10^7 КОЕ/г. Эти значения были выбраны с шагом в один порядок от общепринятой стартовой концентрации 10^6 КОЕ/г. Анализ микробиологической картины осуществляли через 0,5 и 6 месяцев, а также через 24 месяца для оценки хронического эффекта на состояние почвенной микробиоты.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований (таблица) для всех образцов, инокулированных коллекционными штаммами, через 15 сут характерна одинаковая картина – в случае дозы внесения 10^5 КОЕ/г высевается $(1,7\text{-}5,1)\cdot10^7$ КОЕ/г, при стартовой инокуляции 10^7 КОЕ/г – высевается $(1,0–2,9)\cdot10^8$ КОЕ/г. Общее микробное число (ОМЧ) в контрольном образце “почва + нефть” без внесения бактерий – $(6,4–9,4)\cdot10^6$ КОЕ/г. Таким образом, внесение биомассы нефтедеструкторов позволило повысить концентрацию микрофлоры в условиях углеводородного стресса на 1-2 порядка относительно контроля. Оптимальной с экономической точки зрения представляется обработка почвы из расчета 10^5 КОЕ/г, позволяющая достичь рост в 2 порядка при меньших затратах биомассы. В случае необходимости быстрого стимулирования почвенной микрофлоры целесообразны более высокие стартовые дозы.

Таблица.

Общее содержание гетеротрофных микроорганизмов и штаммов-интродуцентов (в скобках) в образцах почвы

Штамм-интродуцент	Посевная концентрация родококков-интродуцентов в почве			
	10^5 КОЕ/г почвы		10^7 КОЕ/г почвы	
	0,5 мес.	6 мес.	0,5 мес.	6 мес.
R. erythropolis F1	$1,7\cdot10^7$ (–)	$2,93\cdot10^5$ (–)	$2,9\cdot10^8$ (–)	$2,83\cdot10^8$ (–)
Rhodococcus sp. F5	$5,1\cdot10^7$ (–)	$6,8\cdot10^6$ (–)	$2,4\cdot10^8$ ($1,6\cdot10^8$)	$1,1\cdot10^7$ (–)
Rhodococcus sp. J8	$3,3\cdot10^7$ (–)	$1,6\cdot10^7$ (–)	$1,5\cdot10^8$ ($0,6\cdot10^8$)	$1,36\cdot10^8$ ($1,03\cdot10^8$)
Rhodococcus sp. B8	$1,9\cdot10^7$ ($0,9\cdot10^7$)	$1,3\cdot10^7$ (–)	$1,0\cdot10^8$ ($0,5\cdot10^8$)	$1,45\cdot10^8$ (–)

Примечание. (–)Колонии штамма-интродуцента не обнаруживаются по фенотипическим признакам.

Учёт доли колоний бактерий-интродуцентов в составе гетеротрофной микрофлоры показал, что в случае внесения 10^7 КОЕ/г штаммы-интродуценты сохранились в составе микробного ценоза – их колонии составили значительный процент среди высеваемых из нефтезагрязнённой почвы бактерий. Степень снижения концентрации углеводородов за 15 сут мало отличалась в различных вариантах опыта и составила 54%, в контроле “почва+нефть” – 38%. В течение 6 месяцев образцы почв регулярно подвергались высушиванию до воздушно-сухого состояния, имитируя типичную ситуацию для почв Юга России с колебаниями влажности, как стрессо-

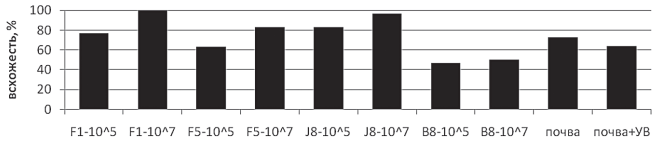


Рисунок. Всхожесть редиса в образцах почвы, инокулированных родококками.

вого фактора для микрофлоры. Штаммы R-морфотипов *Rhodococcus* sp. J8 и B8 оказались более устойчивы к высушиванию, сохранив свою численность на исходном уровне 10^7-10^8 КОЕ/г. Все образцы, инокулированные нефтедеструкторами, имели через 6 месяцев уровни ОМЧ больше, чем контрольные образцы почв (порядка 10^6 КОЕ/г). Уровень каталазной активности был сравним в опытных и контрольных вариантах. Полученные результаты свидетельствуют, что обработка почв нефтеокисляющими бактериями обеспечивает хронический эффект роста численности микробного ценоза. Более эффективны в долговременном плане как интродуценты гидрофобные штаммы R-форм. Аналогичная оценка ОМЧ образцов через 24 месяца показала различную картину для образцов, инокулированных разными штаммами (10^6-10^8 КОЕ/г почвы), на фоне роста фенотипического разнообразия микрофлоры. Важнейшим показателем биоремедиации загрязнённой почвы, является снижение уровня её токсичности – она оценивалась через 24 месяца по всхожести и выходу зелёной биомассы редиса, как стандартного тест-растения для нефтепродуктов. В почвах, инокулированных родококками, в 3 случаях из 4 вариантов отмечено превышение этих показателей над контрольными образцами при инокуляции 10^7 КОЕ/г почвы.

Максимальная всхожесть, как и выход биомассы, наблюдается после обработки штаммом *R. erythropolis* F1, что свидетельствует о показанных ранее фитостимулирующих свойствах (продукция ауксина) данного штамма.

Volchenko N.N., Aleshina N.Y., Pavlov V.V.

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF OIL-CONTAMINATED SOIL WITH INTRODUCED RHODOCOCCI–HYDROCARBON DESTRUCTORS

Kuban State University, Krasnodar, Russia, volchenko.n@mail.ru

Summary. Soil remediation with oil destructors bacteria *Rhodococcus* resulted in its microbiological activity increase. Introduced strains were kept successfully in the microbial cenosis when concentration of 10^7 CFU/g was used. In the long term, hydrofobic strains of R-forms were more effective. Bioaugmentation with *Rhodococcus* bacteria reduced soil phytotoxicity.

Key words: *Rhodococcus*, hydrocarbon destructors, bioaugmentation, phytotoxicity.

УДК 631.46+576.809.51

Горностаева Е.А.[1], *Фокина А.И.*[2], *Кондакова Л.В.*[2], *Злобин С.С.*[2], *Березин Г.И.*[2]

СОДЕРЖАНИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ГРУППОВОЙ СОСТАВ ФОТОТРОФОВ В ПРИРОДНЫХ БИОПЛЁНКАХ *NOSTOC COMMUNE* КАК ОТКЛИК НА ОСОБЕННОСТИ МЕСТООБИТАНИЯ

[1]Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Вятская государственная сельскохозяйственная академия”, г. Киров, Россия, g_lentochka@mail.ru; [2]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Вятский государственный гуманитарный университет”, г. Киров, Россия, anya_var@mail.ru

Резюме: Сообщество биоплёнок *Nostoc commune* различных экотопов отражает специфику техногенного воздействия на окружающую среду. Благодаря многогранности состава и свойств данные уникальные сообщества могут фиксировать изменения, происходящие в природе. При внешне благополучном состоянии почв цианобактерии являются индикаторами техногенной нагруженности экотопа.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, экотоп, природные плёнки *Nostoc commune*.

Введение

Биоплёнки *Nostoc commune* – многовидовые структурированные сообщества с большой плотностью клеток организмов различных систематических уровней. Совокупность предполагаемых механизмов устойчивости микроорганизмов, входящих в состав биоплёнок, делает эти уникальные природные комплексы перспективным объёктом в разработке методов биоиндикации и биоремедиации состояния окружающей среды [1]. Цель настоящего исследования – изучение разницы в степени накопления токсичных металлов, структуры фототрофного комплекса и видового состава в зависимости от специфики антропогенной нагрузки.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили природные плёнки *Nostoc commune,* собранные в октябре 2006 года вдоль обочины шоссейной и железной дорог на окраине г. Дзержинска Нижегородской области, одного из неблагополучных в экологическом отношении городов России. Исследование альго-цианобактериальной микрофлоры проводили путём прямого микроскопирования в сочетании с методами чашечных и водных культур [2]. Содержание тяжелых металлов (ТМ) в почве и биоплёнках определяли методом ААС [3, 4] на базе экоаналитической лаборатории ВятГГУ.

Результаты и обсуждение

Сравнивая результаты, представленные в табл. 1 и 2, необходимо отметить, что в биоплёнке вблизи железной дороги появляется значительное количество гетероцистных форм цианобактерий и одноклеточных водорослей, исчезают нитчатые водоросли, достоверно снижается общее количество клеток.

Таблица 1.

Групповой состав фототрофного комплекса *Nostoc commune* (автодорога)

Группы фототрофов	Численность, клеток/г (x10^9)	Содержание, %
Nostoc commune	2,28 ± 0,11	83,12
Другие ГЦ цианобактерии	0,21 ± 0,01	7,83
БГЦ цианобактерии	0,12 ± 0,01	4,42
Одноклеточные зелёные водоросли	0,113 ± 0,01	4,16
Нитчатые зелёные водоросли	0,013 ± 0,001	0,47
Всего	2,704 ± 0,135	

Таблица 2.

Групповой состав фототрофного комплекса *Nostoc commune* (ж/д дорога)

Группы фототрофов	Численность, клеток/г (• 10^9)	Содержание, %
Nostoc commune	1,61 ± 0,21	81,64
Другие ГЦ цианобактерии	0,05 ± 0,01	2,53
БГЦ цианобактерии	0,21 ± 0,02	10,85
Одноклеточные зелёные водоросли	0,10 ± 0,015	4,98
Всего	1,975 ± 0,1	

Всё это указывает на более высокий уровень токсичности почвы вблизи железнодорожного полотна. Эти данные подтверждаются результатами определения содержания ТМ в биоплёнках (рис. 1).

Цианобактериальные плёнки, как превосходные накопители ТМ, отражают экологическую напряжённость экотопа за счёт тяжёлых металлов. В плёнках вблизи железной дороги, значительно превышающие таковые в плёнках от автодороги, высокие значения концентраций цинка, никеля и меди. Этот факт объясним тем, что в почвы вблизи ж/д попадают при работе железнодорожного транспорта указан-

Таблица 3.

Содержание валовых и подвижных форм тяжелых металлов (мг/кг)

Содержание ТМ	Zn		Cu		Ni		Pb		Cd	
	В.	П.	В.	П.	В.	П.	В.	П.	В.	П.
Автодорога	15,25±1,06	3,14±0,08	6,28±0,09	0,50±0,02	5,99±0,12	0,22±0,003	8,55±0,09	2,43±0,07	0,08±0,01	0,057±0,003
Ж/д дорога	34,85±0,49	3,6225±0,02	5,45±0,03	0,44±0,01	4,48±0,11	–	8,76±0,13-	–	0,177±0,005	0,045±0,002
ПДК	100,00	23,00	55,00	3,00	85,00	4,00	30,00	6,00	ОДК = 0,5	

Примечание. “–”– Менее предела обнаружения; “В.” – валовая форма металла; “П.” – подвижная форма металла.

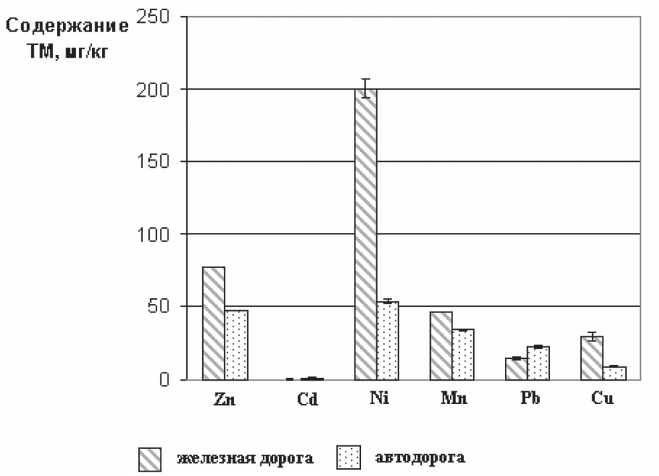


Рисунок. Содержание тяжёлых металлов в природных плёнках *Nostoc commune* из различных экотопов.

ные ТМ сгорании топлива, от трения колёс железнодорожных составов о рельсы, электропроводную систему, коррозии рельсов и проводов. Пробы плёнок, отобранные вблизи автодороги, отличаются более высоким содержанием свинца, что вполне объяснимо: многие годы использования этилированного бензина привело к его накоплению в почве.

Судя по результатам, приведенным в табл. 3, содержание ТМ в почве не превышает ПДК, по данным химического анализа состояния почв вблизи ж/д и автодороги благополучно. Однако состояние биопленок свидетельствует о наличии техногенного влияния и его специфике. Благодаря физиолого-биохимическим особенностям ЦБ обладают свойством концентрировать ТМ, таким образом очищая почву. Но при отмирании микроорганизмов токсиканты возвращаются в окружающую среду.

В биоплёнках, отобранных вблизи автодороги, обнаружены представители 23 видов фототрофов, а вблизи железной дороги – 11 видов, что также подтверждает наличие разницы в экологическом состоянии мест обитания сообществ [1].

Заключение

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что сообщество биоплёнок *Nostoc commune* различных экотопов отражает специфику техногенного воздействия на окружающую среду. Эти уникальные сообщества, благодаря многогранности состава и свойств, могут фиксировать изменения, происходящие в природе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Пегушина О.А., Фокина А.И.* Биоплёнки *Nostoc commune* – особая микробная сфера // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 1. – С. 15–19.
2. *Голлербах М.М., Штина Э.А.* Почвенные водоросли. – Л.: Наука, 1969. – 228 с.
3. Методика выполнения измерений массовых долей токсичных металлов в пробах почв атомно-абсорбционным методом. ФР.1.31.2007.04106. ФБУЗ “Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области”.– 13 с.
4. Методические указания по определению тяжёлых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. М.: ЦИНАО, 1992. – 31 с.

Gornostaeva E.A.[1], *Fokina A.I.*[2], *Kondakova L.V.*[2], *Zlobin S.S.*[2], *Berezin G.I.*[2]

HEAVY METAL CONTENTS AND PHOTOTROPH TYPE COMPOSITION IN NATURAL *NOSTOC COMMUNE* BIOFILMS AS A RESPONSE TO A PARTICULAR HABITAT

[1]Vyatskaya State Agricultural Academy, Kirov, Russia, g_lentochka@mail.ru; [2]Vyatsky State Humanitarian University, Kirov, Russia, anya_var@mail.ru

Summary. The *Nostoc commune* biofilms of various ecotopes reflect specific anthropogenic impacts on the environment. Because of its versatility of composition and properties, this unique community can record changes occurring in nature. Under the outwardly safe state of soil, cyanobacteria are indicators of the anthropogenic loading on the ecotope.

Key words: heavy metals, ecotope, natural *Nostoc commune* films.

УДК 632.122.1

Григориади А.С., Амирова А.Р., Багаутдинова Л.Ф., Киреева Н.А.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *TAGETES ERECTA* ДЛЯ ФИТОРЕМЕЛИОРАЦИИ ТЕРРИТОРИЙ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ВЫБРОСАМИ ПРЕДПРИЯТИЙ НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Башкирский государственный университет”, г. Уфа, Россия, nysha111@yandex.ru

Резюме. Представлены результаты по изучению эффективности применения растений-фиторемедиантов *Tagetes erecta* для санации почвы, загрязненной нефтяными углеводородами и тяжелыми металлами. Показано, что под посевами растений на 30% ускорялась биодеградация нефтяных углеводородов, увеличивалась биологическая активность почвы, в том числе росла численность углеводородокисляющей микробиоты, отмечалась транслокация тяжелых металлов в растения.

Ключевые слова: фиторемедиация, *Tagetes erecta*, нефтяные углеводороды, тяжелые металлы, биологическая активность.

Введение

В условиях неуклонно возрастающего техногенного давления на окружающую среду ее защита от негативного воздействия является одной из серьезных задач экологической биотехнологии. Особое значение имеет снижение степени загрязнения почв, подвергнутых влиянию предприятий нефтяного промышленного комплекса. В результате непосредственного загрязнения нефтепродуктами и аэротехногенного влияния нефтеперерабатывающих предприятий углеводороды концентрируются в почвенном слое. На данном этапе развития науки приоритет отдается биоремедиации нефтезагрязненных почв с использованием объединенного потенциала микроорганизмов и растений.

Перспективным для внедрения в практику оздоровления почвы от токсикантов с нашей точки зрения являются бархатцы прямостоячие (*Tagetes erecta*). Выбор основан на соответствии растения требованиям, предъявляемым к фиторемедиантам. Бархатцы характеризуются быстрым ростом, засухоустойчивостью (это свойство важно, т.к. при нефтяном загрязнении происходит дефицит доступной для растения

Таблица.

Содержание тяжелых металлов в системе “почва-растение” при загрязнении

№	Вариант опыта	Растение/Почва, мг/кг сухой массы	
		Свинец	Кадмий
4	1% нефть	0,5704 / 7,2483	0,4114 / не опр.
5	3% нефть	1,6398 / 8,7085	1,1230 / не опр.
6	6% нефть	2,170 / 11,5220	1,8164 / не опр.

влаги). Следует отметить, что для максимального эффекта необходимо применять растения-фиторемедианты, являющиеся аборигенными видами для местности, где планируется проведение рекультивационных работ. Бархатцы являются видом – космополитом.

Целью данной работы была оценка ремедиационного потенциала *Tagetes erecta* по отношению к нефтяным углеводородам и тяжелым металлам.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на образцах серой лесной почвы (гумус 4,54%, $pH_{водный}$ – 6,1; $N_{общ.}$ – 2507мг/кг), искусственно загрязненной нефтью в концентрациях 1, 3 и 6 вес. %. В качестве контроля использовали растения, произрастающие на незагрязненной почве. Учет численности микроорганизмов проводили через 30 и 60 сут с момента загрязнения по общепринятой методике посева почвенной суспензии на соответствующие питательные среды. Остаточные углеводороды в почве определяли весовым методом [1]. Определение массовой концентрации тяжелых металлов в почве и растениях проводили на атомно-адсорбционном спектрофотометре.

Результаты и обсуждение

Была проведена оценка устойчивости выбранного вида растения к нефтяному загрязнению по физиолого-биохимическим параметрам [2] и была показана устойчивость фотосинтетического аппарата и корневой системы бархатцев к действию нефти.

Одним их главных показателей, по которым определяется степень эффективности проведения фиторемедиационных работ, является содержание остаточных нефтепродуктов под посевами растений. Выращивание фиторемедиантов на почвах, загрязненных нефтью, способствовало интенсификации процессов деградации остаточных углеводородов. Отмечено, что под посевами бархатцев спустя 30 сут произошло разложение до 40% углеводородов. Через 60 сут этот показатель достиг 55-57%, в то время как уровень естественной деградации нефтяных углеводородов не превышал 25% за период эксперимента.

В почве под посевами бархатцев наблюдалось увеличение численности микроорганизмов, использующих минеральные и органические формы азота, целлюлозолитиков, азотфиксаторов, усиливалась ферментативная активность почвы. Особый интерес среди биологических показателей представляет численность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) ризосферы растений. Анализ результатов исследований в лабораторных условиях показал, что посев фитомелиорантов в нефтезагрязненную почву способствовал увеличению численности УОМ (рисунок).

В данной работе рассматривается не только количественное определение основного поллютанта, но и сопутствующих загрязнителей (тяжелых металлов), которые содержатся как в самой нефти, в пластовых водах, так и в составе техногенных выбросов предприятий. Была отмечена активизация транслокации свинца и кадмия в растения (таблица). Видимо, транслокация металлов зависит от концентрации серы в почве. Очевидно, экзогенная сера, попавшая в почву, активировала синтез хелатирующих соединений ризосферной микробиоты.

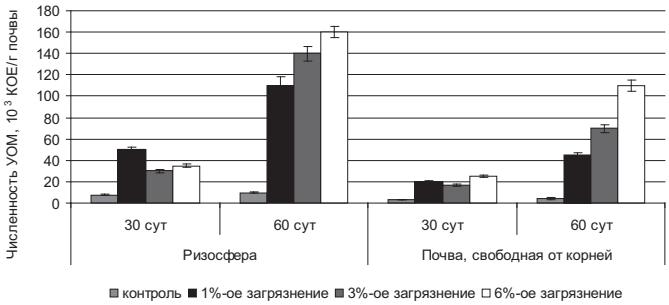


Рисунок. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов под посевами Tagetes erecta при загрязнении нефтью.

Заключение

Таким образом, под посевами бархатцев стимулировалась биологическая активность почвы, ускорялось снижение содержания нефти в почве. Аналогичным образом этот вид растений проявлял свойства гипераккумулянтов тяжелых металлов. Полученные данные свидетельствуют о том, что растения *Tagetes erecta* являются весьма перспективными растениями для проведения фиторемедиации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mc Gill W.W., Rowell M.J.* Determination of oil content of oil contaminated soil // Sci. Tot. Environ. – 1980. – V. 14. – N. 3. – P. 245-253.

2. *Григориади А.С., Багаутдинова Л.Ф., Гуськова Н.С., Киреева Н.А., Баширова Р.М* Физиологические показатели растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв // Тезисы докладов Всеросс. научной конф. “Проблемы сохранения биоразнообразия в северных регионах”. – Апатиты-Кировск, 1-3 октября 2010г. – Апатиты, 2010. – С. 13.

Grigoriadi A.S., Amirova A.R., Bagautdinova L.F., Kireeva N.A.

USE OF *TAGETES ERECTA* FOR PHYOMELIORATION OF SOILS POLLUTED WITH EMISSIONS OF PETROLEUM INDUSTRY

Bashkir State University, Ufa, Russia, nysha111@yandex.ru

Summary. In this work results on studying of efficiency of application of plants-fitoremediantov *Tagetes erecta* for sanitation of the soil polluted by oil hydrocarbons and heavy metals are presented. It is shown that under crops of plants on 30 % biodegradation of oil hydrocarbons was accelerated, biological activity of soil was increased including rising of hydrocarbonoxidizing microorganisms number, the translocation of heavy metals in plants was marked.

Key words: phytoremediation, *Tagetes erecta*, petroleum hydrocarbons, heavy metals, biological activity.

УДК 631.46

Гумерова Р.Х., Низамутдинова А.З., Селивановская С.Ю.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕМЕДИАЦИИ ОТХОДОВ НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕГО КОМПЛЕКСА, СОДЕРЖАЩЕГО РАДИОАКТИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ, МЕТОДОМ ЛАНДФАРМИНГА

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, г. Казань, Россия, gumerovar88@mail.ru

Резюме. Проведено лабораторное моделирование процесса ремедиации отхода нефтедобывающего комплекса, содержащего естественные радиоактивные элементы (^{226}Ra, ^{232}Th и ^{40}K), методом ландфарминга. Оценено влияние отходов на микробное сообщество почвы. Установлено, что в течение 90 суток инкубирования смеси почвы с отходом в соотношении 4:1 происходит снижение углеводородов от 154 г/кг (1 сут) до 54 г/кг (90 сут). Внесение отходов приводит к снижению микробной биомассы и увеличению респираторной активности. После 120 сут инкубирования происходит восстановление микробного сообщества.

Ключевые слова: ландфарминг, радиоактивные отходы, нефть, ремедиация.

Введение

В процессе добычи нефти образуется большое количество отходов. Эти отходы выделяются на поверхности насосно-компрессорных труб

при протекании по промысловому контуру водо-нефтяной эмульсии. Периодически оборудование подвергается очистке, а отходы размещаются на почве, что наносит вред окружающей среде [1].

В состав отходов входят нефтяные углеводороды (40–60%), минеральные частицы (5–40%) и вода 30–90%. Часть таких отходов может содержать, помимо углеводородов элементы естественных радиоактивных семейств U^{238} и Th^{232}, а также K^{40}. Доминирующими радионуклидами являются ^{226}Ra и ^{228}Ra, концентрации которых изменяются в пределах от 1 до 400 кБк/кг [2].

Значительный вклад в процесс биодеградации нефтяных компонентов вносят организмы, способные использовать углеводороды в качестве единственного источника органического вещества и энергии[3]. Такие формы имеются только среди микроорганизмов. Так как углеводородокисляющие микроорганизмы являются постоянным компонентом почвенных биоценозов – их катаболическая активность используется для ремедиации нефтезагрязненных почв.

Таким образом, целью настоящего исследования явилась оценка возможности процесса ремедиации отходов методом ландфарминга в условиях лабораторного моделирования.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служил отход, отобранный в резервуаре Тихоновского товарного парка (Республика Татарстан). Характеристика отхода приведена в таблице.

Таблица.

Характеристика анализируемого отхода

Нефть, %	Радиоактивность, Бк/кг		
	Радий	Торий	Калий
72	2739	916	271,15

Для моделирования процесса ландфарминга смешивали почву с отходом в соотношении 4:1, помещали в стеклянные сосуды и инкубировали при 20°С в течение 120 сут. В качестве контроля использовали необработанную почву. Инкубирование опытного и контрольного вариантов проводили в трехкратной повторности. Через 1, 30, 90 и 120 сут были отобраны пробы, в которых определяли содержание углеводородов, микробную биомассу, респираторную активность, метаболический коэффициент.

Результаты и обсуждение

В результате процесса ландфарминга содержание углеводородов в почве, загрязненной нефтяным отходом, снизилось от 154 г/кг (1 сут) до 54 г/кг (90 сут). Изменение содержания радиоактивных элементов в процессе эксперимента не было обнаружено.

В целом во всех точках измерения уровень микробной биомассы в почве с внесенным отходом был меньше, по сравнению с чистой почвой, причем наиболее выраженный эффект наблюдали на начальном этапе. Установлено, что через 1 сут после внесения отхода микробная биомасса снизилась в 2 раза относительно контрольного варианта опыта и составила 378,97 мг C_{mic} /кг. Через 4 месяца негативный эффект оказался меньше (ингибирование составило менее 30%), что свидетельствует о некотором восстановлении сообщества.

Внесение отхода привело к увеличению респирации через 1 и 30 сут на 20 и 60 % соответственно по сравнению с контролем. Через 90 и 120 сут инкубирования респираторная активность уменьшилась и достоверно не отличалась от контрольного образца. Такое изменение уровня биомассы и респираторной активности является следствием внесения экзогенных соединений. Ингибирующий эффект на биологические параметры почвы, согласно данным литературы, отмечается при содержании нефти 10-30% [4]. Ответный отклик микробного сообщества зависит и от времени, прошедшего с момента поступления нефти в почву. Последнее связано как с различной токсичностью, доступностью и скоростью биодеградации исходных нефтяных компонентов, так и с различием метаболитов, образующихся в процессе деструкции нефти [5].

Отмечено, что через 1 сут после внесения отхода, метаболический коэффициент в опытном образце на 60% превышает контрольный вариант опыта, что свидетельствует о нарушенности сообщества. Через 90 сут различия метаболического коэффициента в опытном и контрольном варианет снижаются, а к 120 сут достоверные отличия отсутствуют, что может свидетельствовать о преодолении стресса микробным сообществом.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности ремедиации почв, на которых были размещены отходы нефтедобывающего производства, методом ландфарминга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-00263-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abo-Elmagd M., Soliman H.A., Salman Kh.A., El-Masry N.M.* Radiological hazards of TENORM in the wasted petroleum pipes // J. Environ. Radioact. – 2010. – V.101 – P. 51-54.

2. *Awwad N.S.* Characterization of the TE-NORM waste associated with oil and natural gas production in Abu Rudeis, Egypt // J. Environ. Radioact. – 2005. – V. 82. – P. 7-19.

3. *Пиковский Ю.И.* Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. – М: Изд-во МГУ, 1993. – 208 с.

4. *Li H.* Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment // J. Environ. Sci. – 2007. – V.19. – P. 1003-1013.

5. *Serrano A.* Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill // Sci. Total Environ. – 2009. – V. 407. – P. 4056-4061.

Gumerova R. Kh., Nizamutsinova A.Z., Selivanovskaya S.Yu.

MODELING OF REMEDIATION OF THE OILY WASTE CONTAINING NATURAL RADIOACTIVE ELEMENTS USING LANDFARMING METHOD

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia,

gumerovar88@mail.ru

Summary. Laboratory modeling of remediation process of the oily waste containing natural radioactive elements using landfarming method was carried out. It was established that during the 120 days incubation of the soil mixture in the ratio 4:1 there was a decrease in hydrocarbons from 154 to 54 g/kg. Spiking soil with waste leads to decrease in a microbial biomass and increase in microbial respiration and metabolic activity. These effects can be caused by the stress response of soil microbial biomass to contamination. It was revealed that over the 120 days of incubation the microbial community restored its function.

Key words: remediation, radioactive waste, landfarming, petroleum.

УДК 579.84

Данг Т.Т.[1], Логинова О.О.[1], Белоусова Е.В.[1], Шевченко М.Ю.[2], Грабович М.Ю.[1]

КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ РОДА *ACINETOBACTER* ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Воронежский государственный университет”, г. Воронеж, Россия, curly_999@mail.ru; [2]ООО “ВегаЭКО”, г. Воронеж, Россия, maximlep@mail.ru

Резюме. На основании полифазного таксономического анализа штаммы B-2838 и B5064 идентифицированы как представители *Acinetobacter calcoaceticus*, штамм B-3730 – как представитель вида *A. radioresistans*. Исследуемые штаммы способны использовать в качестве единственного источника углерода отдельные углеводороды нефти, нециклической (C_7–C_{16}), циклической (C_6) и ароматической природы (C_{14}). Выявлена способность данных штаммов к образованию биосурфактантов. Показано, что степень деградации нефтепродуктов отработанного машинного масла штаммами *Acinetobacter* spp. в микрополевом опыте составила от 20 до 5% в течение 60 сут. Обоснована возможность использования консорциума данных штаммов в составе биопрепарата. При этом основ-

ная роль *A. radioresistens* – ферментативное окисление нефтепродуктов (штамм В-5064 эффективно окисляет нефть, штамм В-2838 – бензин), а *A. calcoaceticus* В-3780 – продукция эффективного биосурфактанта.

Ключевые слова: биоремедиация, *Acinetobacter*, нефтепродукты, разрушение нефтепродуктов.

С каждым годом все больше внимания уделяется проблемам, связанным с загрязнением окружающей среды. Добыча, переработка и транспортировка нефти тяжело сказываются на состоянии почвенного покрова Земли. Почва, обладающая огромной адсорбирующей способностью, аккумулирует в себе большую часть нефтяных загрязнений, при этом изменяются ее физические, агрохимические и микробиологические характеристики. При разливах нефти нарушается нормальное функционирование почвенной экосистемы, ухудшается почвенное плодородие, меняется интенсивность окислительно-восстановительных процессов, направление метаболических процессов. В условиях роста уровня техногенной нагрузки на окружающую среду актуальной проблемой остается обезвреживание твердых отходов, таких как осадки очистных сооружений, грунты на территории нефтебаз, мойки автотранспорта, аварийные разливы. Известно, что при легком механическом составе, например супесчаных и суглинистых почв, легкие фракции нефти могут проникать на глубину до 1,5-2,0 м, уничтожая все живое и подавляя биологическую активность почв; физические методы очистки здесь совершенно неэффективны. Наиболее эффективен биологический метод, который заключается в направленной активизации почвенной микрофлоры, внесении микробных препаратов, разлагающих нефть.

Целью нашей работы было установление таксономического статуса штаммов *Acinetobacter* sp. В-5064, В-2838, В-3780 и изучение возможности использования их для биоремедиации нефтезагрязненных почв в условиях местного региона.

Согласно проведенному полифазному таксономическому анализу, включающему исследование морфологических, физиолого-биохимических и филогенетических свойств представителей рода *Acinetobacter*, было установлено, что штамм В-3780 принадлежит к виду *A. radioresistens*, а штаммы В-2838 и В-5064 – к виду *A. calcoaceticus*.

Исследуемые культуры способны к использованию углеводородов нефти в качестве единственного источника углерода. Установлена высокая деструктивная активность штаммов в отношении сырой нефти и индивидуальных углеводородов. Выявлено, что все исследованные штаммы проявляют эмульгирующую активность в отношении углеводородов за счет синтеза биосурфактантов. Были получены бисурфактанты из всех исследуемых культур и изучены их коллоидно-химические свойства. Так, исходя из формы изотерм поверхностного натяжения было установлено, что биоПАВ двух штаммов (В-2838, В-5064) являются немицелообразующими, в то время как ПАВ штамма В-3780 может оказаться мицеллообразующим при условии создания растворов большей концентрации. Кривые зависимости σ(С), а также значения поверхностных активностей, рассчитанные для трех исследуемых ПАВ, свидетельствуют о том, что штамм В-3780 обладает значительно большей способностью снижать поверхностное натяжение воды и, следовательно, большей поверхностной активностью.

Выявлена высокая скорость деградации нефтепродуктов при интродукции штаммов *Acinetobacter* spp. в лабораторном, вегетационном и микрополевом опытах. При постановке лабораторного опыта степень деградации нефти за 40 сут составила от 40,34 до 73,59% для разных штаммов; а окисление бензина – от 72,16 до 99,69% соответственно. При постановке вегетационного опыта использовали штамм В-2838. В ходе эксперимента деструкция нефтепродуктов составила от 40 до 60% в течение 40 сут. При постановке микрополевого эксперимента использовали все три штамма. Были заложены 5 опытных делянок. В течение 60 сут деструкция нефтепродуктов в системе “масло” составила 8,83%, в системе “масло + опилки” – 14,35%, а в системах “масло + бактерии” и “масло + опилки + бактерии” – 48,37 и 20,98% соответственно. В системе “почва + отработанное масло + бактерии” наблюдали наибольший прирост общей численности клеток и увеличение коэффициента гумификации, что свидетельствует о положительной направленности гумусообразования, способствующего повышению плодородия почвы.

Таким образом, применение консорциума трех исследуемых штаммов в составе биопрепарата позволит повысить эффективность процесса биоремедиации на супесчаных почвах Воронежской области: основная роль *A. radioresistens* – ферментативное окисление нефтепродуктов (В-5064 эффективно окисляет нефть, В-2838 – бензин), а *A. calcoaceticus* В-3780 продуцирует биосурфактант.

Dang T.T.[1], Loginova O.O.[1], Belousova E.V.[1], Shevchenko M.Yu.[2], Grabovich M.Yu.[1]

THE CONSORTIUM OF STRAINS OF BACTERIA-OIL DESTRUCTORS OF THE GENIUS *ACINETOBACTER* FOR BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOIL

[1]Voronezh State University, Voronezh, Russia, curly_999@mail.ru; [2]”VEGA-Eco”, Voronezh, Russia, maximlep@mail.ru

Summary. Based on polyphase taxonomical analysis, strains B-2838 and B-5064 were identified as *Acinetobacter calcoaceticus*, the strain B-3730 – as *A. radioresistans*. The strains were able to use some petroleum hydrocarbons, namely aliphatic (C_7–C_{16}), cyclic (C_6) and aromatic (C_{14}) as sole carbon sources. Their ability for biosurfactant production was also found. In the micro-field experiment, the biodegradation degree of waste oil was 20-50% after 60 days. The results indicate the possibility of effective application of the consortium of these three strains studied in biological preparations. The main role of *A. radioresistens* is the enzymatic oxidation of petroleum products (strain B-5064 effectively oxidizes oil, strain B-2838 – petrol), and *A. calcoaceticus* B-3780 produces an effective biosurfactant.

Key words: bioremediation, *Acinetobacter*, petroleum products, oil degradation.

УДК 574.24

Егорова А.С.

АДАПТАЦИЯ ВИДА *PECILOMYCES LILACINUS* (THOM) SAMSON К РАДИОАКТИВНОМУ ЗАГРЯЗНЕНИЮ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, г. Москва, Россия, as.egorova@gmail.com

Резюме. Штаммы микроскопического гриба *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, выделенные из почвы зоны отчуждения Чернобыльской АЭС, обладали рядом свойств, среди которых агрегированный рост гиф, увеличение скорости роста при пониженном содержании глюкозы в среде, повышенная устойчивость к окислительному стрессу и увеличение биосинтеза меланиновых пигментов. Способность выживать в экстремальных условиях делает данный микроскопический гриб удобной моделью для исследования эволюционных процессов у экстремофильных грибов.

Ключевые слова: экстремофильные грибы, окислительный стресс, меланины.

Грибы имеют фундаментальное значение и играют важную роль в патогенезе, симбиозе и круговороте элементов. По своим трофическим характеристикам подавляющее большинство грибов относится к группе редуцентов, разрушающих различные растительные и техногенные субстраты. Ранее было показано, что микроскопические грибы способны употреблять и перемещать в своём мицелии радионуклиды. Фильтры, изготовленные из мёртвого мицелия (клеточных стенок), используются для сорбции тяжелых металлов и радионуклидов из промышленных источников. Для выживания в неблагоприятной среде грибы выработали ряд защитных механизмов. Среди них отсутствие половой стадии развития, синтез пигментов меланиновой природы, а также способность к росту в олиготрофных условиях.

Исследования грибных сообществ зоны отчуждения Чернобыльской АЭС показали их изменение под действием радиации и, как результат, формирование простых сообществ с доминированием представителей меланин-содержащих видов. За последние 20 лет из зоны отчуждения ЧАЭС был выделен широкий спектр грибов, некоторые из которых обладали ранее неизвестными чертами адаптации, например, такими, как рост, направленный к источникам радиации. Механизмы этого явления имеют огромное экологическое значение для ремедиации почв.

Таблица.

Характеристика местообитания и концентрация парамагнитных центров у штаммов *P. lilacinus*

Штамм	Место и год выделения	Радиоактивное загрязнение,Бк/кг	Концентрация ПЦ, спин/г сухой массы
1941	Дерново-подзолистая почва Рыжего леса, зона отчуждения ЧАЭС, 1994 г.	$5{,}9\cdot10^{5}$	$4{,}6\cdot10^{16}$
1492	Дерново-подзолистая почва Рыжего леса, зона отчуждения ЧАЭС, 1992 г.	$2{,}7\cdot10^{5}$	$3{,}8\cdot10^{16}$
744	Дерново-подзолистая почва Рыжего леса, зона отчуждения ЧАЭС, 1992 г.	$1{,}3\cdot10^{3}$	$3{,}4\cdot10^{16}$
1786	Дерново-подзолистая почва Рыжего леса, зона отчуждения ЧАЭС, 1993 г.	$1{,}2\cdot10^{2}$	$7{,}9\cdot10^{16}$
CP-09	Дерново-подзолистая почва, Московская обл., г. Воскресенск, 2009 г.	Фоновый*	–
SM	Дерново-подзолистая почва, Смоленская обл., село Гнездово, 2004 г	Фоновый*	$2{,}2\cdot10^{16}$

Примечание. *Фоновый уровень радиоактивности соответствует плотности поверхностного загрязнения по 137Cs до 1 Ки/км2 (3,7 Бк/см^2) [1].

Paecilomyces lilainus – широко распространенный представитель несовершенных грибов. Грибы данного вида часто выделяют из ненарушенных зональных почв, установлено, что они с повышенной частотой встречаются в местообитаниях, подверженных различным антропогенным нагрузкам. В настоящий момент представители вида *P. lilacinus* доминируют в зоне отчуждения ЧАЭС, данный вид рассматривается как биоиндикатор высоких ($3{,}7\times10^{6}$–$3{,}7\times10^{8}$ Бк/кг) уровней загрязнения почв радиоизотопами.

Цель настоящей работы – изучение механизмов устойчивости представителей вида *P. lilacinus* к радиоактивному загрязнению. В задачи исследования входило исследование морфологических, физиологических и биохимических особенностей представителей данного вида под действием стресса. В работе использовали четыре штамма, изолированные из зоны отчуждения ЧАЭС с различными ($1{,}2\times10^{2}$–$5{,}9\times10^{5}$ Бк/кг) уровнями радиоактивности, два штамма из местообитаний с фоновым уровнем радиоактивности служили контролем (см. таблицу).

Исследование морфологии мицелия штаммов *P. lilacinus* выявило агрегацию гиф у штаммов, выделенных из радиоактивно загрязненных местообитаний. При исследовании влияния концентрации глюкозы на рост исследованных штаммов в широком (от 0,002 до 5%) диапазоне концентраций было показано значительное увеличение радиальной скорости роста у штаммов из почвы зоны отчуждения ЧАЭС в условиях низкого содержания глюкозы в сравнении с контрольными штаммами.

Известно, что ионизирующее излучение сопряжено с образованием активных форм кислорода (АФК), которые вызывают окислительный стресс в клетках и их гибель. В клетках с аэробным типом метаболизма наиболее долгоживущий продукт трансформации АФК – перекись водорода. Она представляет несомненный интерес для моделирования действия радиации на живые объекты, так как около 90% ущерба от радиоактивного излучения связано с действием продуктов радиолиза воды. Мы моделировали окислительный стресс воздействием 10мМ H_2O_2. В качестве показателя окислительного стресса рассматривали карбонильные группы в белках мицелия штаммов *P. lilacinus*. У штаммов, изолированных из зоны отчуждения ЧАЭС, обнаружили повышенную устойчивость к окислительному стрессу. При определении активности основных антиоксидантных ферментов (каталазы и супеорсиддисмутазы) установлено, что активность ферментов была штаммоспецифична и не зависела от первичного местообитания.

Защитные свойства меланинов хорошо известны. Методом ЭПР-спектроскопии выявили наличие меланиновых пигментов в мицелии *P. lilacinus*. Во всех исследованных штаммах зарегистрировано наличие сигнала, характерного для меланинов. Наибольшее количество парамагнитных центров (ПЦ) обнаружено в мицелии штаммов, выделенных из зоны отчуждения ЧАЭС (см. таблицу), что в 2,0-2,5 раза превышает таковой показатель у штаммов из ненарушенных местообитаний. Эти данные согласуются со сведениями о меланизации микобиоты зоны отчуждения ЧАЭС.

Таким образом, штаммы *P. lilacinus* из радиоактивно загрязненных местообитаний обладают следующими свойствами: способность к олиготрофному росту, высокая устойчивость к окислительному стрессу, повышенный биосинтез меланинов. Способность выживать в экстремальных условиях делает представителей *P. lilacinus* удобной моделью для исследования эволюционных процессов у экстремофильных грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гос. доклад “О состоянии окружающей природной среды в РФ в 2000 г.” Раздел 7. Радиационная обстановка. – М.: Мин-во природ. ресурсов РФ, 2001. – С. 51–56.

Egorova A.S.

ADAPTATION OF *PAECILOMYCES LILACINUS* (THOM) SAMSON TO RADIOACTIVELY-POLLUTED HABITAT

A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS, Moscow, Russia,
as.egorova@ gmail.com

Summary. Strains of microscopic fungi *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson isolated from soil of the Chernobyl NPP zone possessed the following properties: aggregation of hyphae; aggregate growth of hyphae, the increase in the growth rate at low glucose content in media, high resistance to oxidative stress, and increased biosynthesis of melanin pigments. The ability to survive in extreme environments makes this microscopic fungus a convenient model for the study of evolutionary processes in extremophilic fungi.

Key words: extremophilic fungi, oxidative stress, melanin.

УДК 579.87–579.222.2–579.222.4

Егорова Д.О.[1,2], Плотникова Е.Г.[1,2]

РАЗЛОЖЕНИЕ СМЕСИ ХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ С ПРЕОБЛАДАНИЕМ ТЕТРАЗАМЕЩЕННЫХ КОНГЕНЕРОВ ШТАММОМ *MICROBACTERIUM* SP. B51

[1]Учереждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, peg@iegm.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет” г. Пермь, Россия, daryao@rambler.ru

Резюме. Исследовано разложение полихлорированных бифенилов (ПХБ) штаммом *Microbacterium* sp. B51. Показано, что штамм разлагает 100% смеси ПХБ, содержащей в своем составе (три-гекса) хлорированные бифенилы. *Microbacterium* sp. B51 осуществляет деструкцию всех присутствующих в смеси хлорбифенилов без накопления токсичных метаболитов.

Ключевые слова: *Microbacterium*, полихлорированные бифенилы, разложение.

Введение

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) являются одними из опаснейших экотоксикантов, широко распространенных в окружающей среде в результате промышленной деятельности человека. Очистка территорий, загрязненных ПХБ, осложнена уникальными физико-химическими свойствами данных соединений [1].

Многолетними исследованиями установлено, что наиболее эффективным способом восстановления территорий, загрязненных ПХБ, является их ремедиация с использованием деградативного потенциала микроорганизмов, в частности, бактериальных штаммов. Большинство описанных штаммов-деструкторов осуществляют разложение конгенеров ПХБ, содержащих 1-3 заместителя в молекуле. Однако смеси ПХБ, широко использовавшиеся до 2001 года в промышленности, содержали в основном конгенеры с 4-9 заместителями в молекуле бифенила. Наличие хлорбифенилов (ХБ) такого состава обнаруживает-

ся в больших количествах не только на техногеннозагрязненных территориях, но и в природных экосистемах [1]. В связи с этим представляется актуальным поиск бактерий, способных осуществлять трансформацию/деструкцию средне- и высокохлорированных бифенилов. Цель настоящей работы – изучение разложения смеси (три-гекса)хлорированных бифенилов штаммом *Microbacterium* sp. B51.

Материалы и методы исследования

Штамм *Microbacterium* sp. B51 выделен из техногенной почвы, загрязненной отходами химических и соледобывающего предприятий г. Березники Пермского края [2]. Деструкцию смеси А (смесь ПХБ, содержащая 88.3% тетра-ХБ) [3] осуществляли в эксперименте с отмытыми клетками, как описано [2, 3]. Смесь А вносили в виде ацетонового раствора до конечной концентрации 32 мг/л. Культивирование проводили при +20°С. Продукты деградации определяли на спектрофотометре BioSpec-mini ("Shimadzu", Япония) при длинах волн 390-440 нм и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф LC-10ADvp, детектор RF-10Axl "Shimadzu", Япония, колонка Lichrosorb RP-18 10U 250 x 4.6 мм "Alltech", США) [3].

Результаты и обсуждение

Штамм *Microbacterium* sp. B51 активно разлагал хлорбифенилы смеси А (см. таблица). Установлено, что за первые сутки культивирования суммарная концентрация хлорбифенилов уменьшалась на 68 %, а к концу третьих суток ПХБ в среде отсутствовали. Анализ имеющихся в литературе данных о штаммах, способных осуществлять деструкцию коммерческих смесей ПХБ (Ароклор 1242 и Ароклор 1248) близких по конгенерному составу к смеси А, показал, что уровень деструкции ПХБ смеси А штаммом *Microbacterium* sp. B51 превышает аналогичный показатель как для известных штаммов, так и для изученных нами ранее [3, 4].

Таблица.

Разложение хлорированных бифенилов (смесь А) штаммом *Microbacterium* sp. B51

Время, ч	Смесь А, мг/л	(Cl)ГОФДК, $ОП_{390-440}$	Производные бензойной кислоты, мг/л	
			2ХБК	2,4ХБК
0	32,0±0,01	н.д.	н.д.	н.д.
24	11,73±0,02	н.д.	0,229±0,004	0,128±0,002
48	0,15±0,01	н.д.	0,208±0,005	0,165±0,003
72	0	н.д.	0	0,296±0,002

Примечание. Смесь А – смесь ПХБ, содержащая 88,3% тетра-ХБ; н.д. – не детектировалось: (Cl)ГОФДК – (хлор)гидрокси-оксо-фенилгексадиеновая кислота; ХБК – хлорбензойная кислота.

Аэробное разложение ПХБ бактериями осуществляется с использованием энзиматического потенциала метаболической системы окислительной деструкции бифенила [1, 2]. В результате диоксигеназной атаки происходит расщепление одного из колец молекулы (хлор)бифенила с образованием (хлор)гидрокси-оксо-фенилгексадиеновой кислоты (ГОФДК), которая далее расщепляется на (хлор)бензойную (ХБК) и пентадиеновую кислоты.

Показано, что при культивировании штамма B51 в присутствии хлорбифенилов (смеси А) в среде не накапливается (Cl)ГОФДК, но присутствуют незначительные количества хлорбензойных кислот (ХБК) (см. таблица). Полученные данные свидетельствуют о высокой активности ферментов аэробного разложения бифенила исследуемого штамма по отношению к (три-гекса)хлорированным бифенилам.

В отличие от большинства известных бактерий-деструкторов бифенила штамм *Microbacterium* sp. B51 осуществляет разложение 2-хлорбензойной кислоты (2ХБК) (см. таблица) [2]. Таким образом, 2-хлорбензойная кислота не является конечным продуктом при разложении хлорированных бифенилов исследуемым штаммом.

Снижение концентрации ПХБ в смесях при аэробной бактериальной деструкции чаще всего обусловлено разложением низкохлорированных бифенилов. Установлено, что штамм *Microbacterium* sp. B51 проявляет деструктивную активность по отношению ко всем конгенерам смеси А. В течение первых суток происходит разложение три- и тетр-ХБ, пента- и гекса-ХБ подвергаются деструкции в течение последующих двух суток эксперимента (данные не показаны).

Заключение

Таким образом, штамм *Microbacterium* sp. B51 эффективно утилизирует смесь (три-гекса)-ХБ и может быть рекомендован для использования в технологиях ремедиации ПХБ-загрязненных территорий зоны умеренного климата.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-96028р_урал_а) и УрО РАН (грант №10-4-ИП-161).

ЛИТЕРАТУРА

1. Seventh meeting of the Persistent' Organic Pollutants Review Committee (POPRC), Geneva, Switzerland, 10–14 October 2011. http://chm.pops.int. [27.09.2011].

2. *Рыбкина Д.О., Плотникова Е.Г., Дорофеева Л.В., Мироненко Ю.Л., Демаков В.А.* Новый аэробный грамположительный микроорганизм с уникальными свойствами деструкции *орто*- и *пара*-хлорированных бифенилов // Микробиология. – 2003. – Т. 72. № 6. – С. 759–765.

3. *Егорова Д.О., Демаков В.А., Плотникова Е.Г.* Разложение смеси (три-гекса)хлорированных бифенилов штаммами рода *Rhodococcus* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. № 6. В печати.

4. *Bedard D.L., Wagner. R.E., Brennan M.J.* et al. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850 // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. № 5. – P. 1094–1102.

Egorova D.O.[1,2], Plotnikova E.G.[1,2]

DEGRADATION OF MIXTURES OF CHLORINATED BIPHENYLS WITH A PREDOMINANCE OF TETRASUBSTITUTED CONGENERS BY STRAIN *MICROBACTERIUM* SP. B51

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, daryao@rambler.ru; [2]Perm State National Research University, Perm, Russia, peg@iegm.ru

Summary. Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by strain *Microbacterium* sp. B51 was investigated. It was shown that this strain decomposed 100% of the PCB mixture containing (three-hexa) chlorinated biphenyls. *Microbacterium* sp. B51 degrades all congeners present in the mixture without accumulating toxic metabolites.

Key words: *Microbacterium*, polychlorinated biphenyls, degradation

---

УДК 579.222:547.36

Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Актуганов Г.Э., Маркушева Т.В.

ХАРАКТЕРИСТИКА КОНСОРЦИУМА БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ 2,4,5-ТРИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

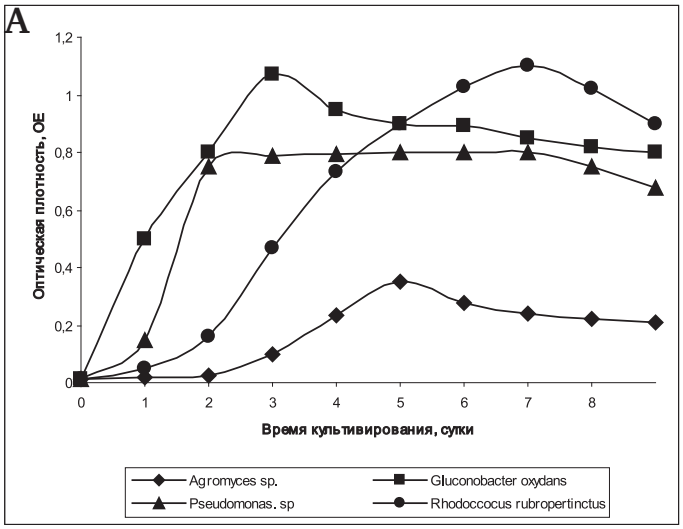
Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия, tvmark@anrb.ru

Резюме. Из образца почвенной микробиоты, подвергавшейся воздействию факторов нефтехимического производства, выделен новый природный консорциум бактерий-деструкторов 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т). Исследована биодеградационная, хитинолитическая и антагонистическая активность членов консорциума.

Ключевые слова: антагонизм, бактерии-деструкторы, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т).

Введение

В настоящее время особый интерес вызывают природные сообщества бактерий, вовлекающие в обмен веществ хлорированные соединения ароматического ряда. Интерес к деструкторам хлорированных галогенидов инициируется перспективами их применения в технологиях очистки среды от ксенобиотиков. Биоремедиация с использованием консорциумов микроорганизмов имеет ряд экологических преимуществ по сравнению с другими методами [1].



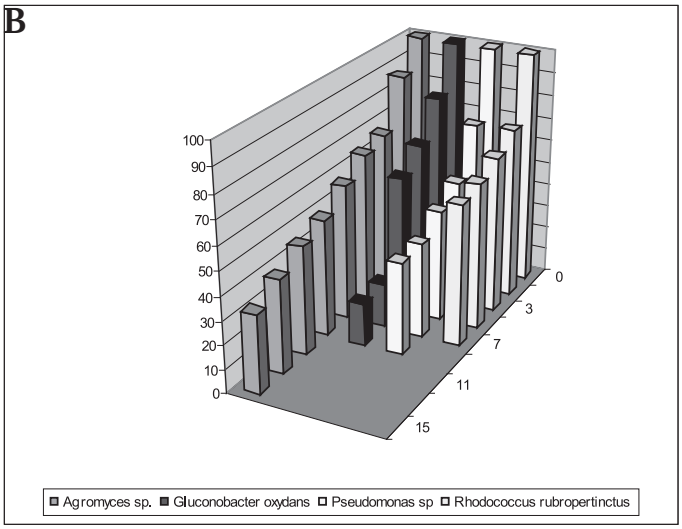


Рис.1. Зависимость значений оптической плотности клеточных суспензий OD_{590} от времени инкубации штаммов *Agromyces* sp. 34DCP, *Pseudomonas* sp. 34T, *G. oxydans* 2T и *R. rubropertinctus* 5D в условиях использования 2,4,5-T в качестве источника углерода и энергии (A). Динамика содержания 2,4,5-T в среде культивирования (B).

Эффективность применения микроорганизмов во многом зависит от понимания их взаимодействия как внутри консорциума, так и с другими организмами внешней среды. В этом аспекте одной из важных характеристик деструкторов является хитинолитическая активность, которая часто связана с антагонистической активностью к фитопатогенным грибам.

Цель настоящей работы состояла в получении физиолого-биохимических характеристик, включая антагонистическую активность членов консорциума природных бактерий-деструкторов 2,4,5-T.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования были использованы штаммы бактерий, подвергавшиеся воздействию факторов химического производства, отнесенные к бактериальным родам *Agromyces*, *Pseudomonas*, *Gluconobacter* и *Rhodococcus*.

Чистые культуры микроорганизмов были выделены по методу Коха с небольшими модификациями. Идентификация штаммов была произведена согласно признакам фенотипической и физиолого-биохимической дифференциации бактерий [4]. Рост культур оценивали по стандартным показателям, включая оценку значений оптической плотности клеточной суспензии. Контроль содержания гербицидов в культуральной жидкости проводили согласно руководству "Методы определения микроколичеств пестицидов" с небольшими модификациями (1984).

Для изучения антагонистических взаимоотношений использовали метод перпендикулярных штрихов. На поверхность агаризованной среды штрихом засевали исследуемый штамм. Чашку инкубировали при оптимальной для роста температуре. Далее перпендикулярно к выросшему штриху подсевали штрихами тест-культуры, после чего чашки вновь инкубировали в термостате [2].

Для выявления хитинолитической активности исследуемые штаммы выращивали на богатой плотной питательной среде с коллоидным хитином. Об активности бактерий-деструкторов судили по формированию зон просветления хитина в агаре вокруг колоний в течение 12 суток инкубации. Антагонистическую активность культур по отношению к фитопатогенным грибам оценивали методом укола в двойной синхронной культуре на картофельно-глюкозном агаре. В качестве тестового организма брали фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* ИБ Г-12.

В условиях периодической культуры была изучена динамика роста и использования 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-T) в качестве единственного источника углерода и энергии. На рисунке 1 представлены графики, отражающие зависимость значений оптической плотности клеточной суспензии OD_{590} от времени инкубации, а также динамику изменения концентраций ксенобиотика в среде культивирования.

Результаты и обсуждения

Оценка динамики использования 2,4,5-T в качестве единственного источника углерода и энергии выявила, что наиболее эффективным деструктором данного субстрата является штамм *G. oxydans* 2T. Снижение содержания 2,4,5-T в среде происходило постепенно: к 3-м сут опыта, оно уменьшалось на 34%, далее к 5-м - на 42%, а к 9-м сут - на 82% от контроля. Два штамма *Agromyces* sp. 34DCP и *Pseudomonas* sp. 34T конверсию данного соединения осуществляли к 9-15 сут культивирования до 33 и 39%, соответственно. Менее эффективно утилизировал 2,4,5-T *R. rubropertinctus* 5D, который снизил концентрацию субстрата в среде культивирования на 40% от исходной.

Анализ антагонистической активности показал что, культуры *Agromyces* sp. 34DCP, *Pseudomonas* sp. 34T, *G. oxydans* 2T и *R. rubropertinctus* 5D не проявляли антагонизма.

При тестировании штаммов консорциума на хитинолитическую активность было установлено, что бактериальные штаммы *Pseudomonas* sp. 34T и *G. oxydans* 2T гидролизуют хитин на плотной питательной среде. Необходимо отметить, что хитиназная активность штамма *Gluconobacter oxydans* ранее описана не была.

Проверка на антагонистическую активность по отношению к фитопатогену *Bipolaris sorokiniana* ИБ Г-12 показала, что культура *Pseudomonas* sp. 34T подавляет рост грибных клеток.

Заключение

В результате работы было установлено, что бактерии-деструкторы 2,4,5-T природного консорциума не проявляют взаимного антагонизма. При этом у штамма *Pseudomonas* sp. 34T обнаружена способность к активному подавлению роста фитопатогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* ИБ Г-12. Наличие среди членов консорциума бактерий-деструкторов антагонистов патогенов растений имеет существенное значение для формирования интегрированного подхода к биоремедиации загрязненных гербицидами почв в сочетании со снижением их инфекционного фона.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мельников Н.Н., Белан С.Р.* Органические соединения хлора в окружающей среде // Агрохимия. – 1998. – .№ 10. – С. 83–93.

2. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608с.

Zharikova N.V., Zhurenko E.Y., Korobov V.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Aktuganov G.E., Markusheva T.V.

CHARACTERIZATION CONSORTIUM OF BACTERIA- DESTRUCTORS OF 2,4,5-TRICHLOROPHENOXYACETIC ACID

Institute of biology of the Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa, Russia, tvmark@anrb.ru

Summary. The natural consortium bacteria-destructor 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid have been isolated from soil microorganisms populations subjected to the factors of chemical production. Have been investigated degradation and antagonistic activity of the members of the consortium.

Key words: Antagonism, bacteria-destruction, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid.

УДК 631.46

Корчагина И.В., Свистова И.Д.

МИКРОБИОИНДИКАЦИЯ УРБАНОЗЕМОВ ГОРОДА ВОРОНЕЖА

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Воронежский государственный педагогический университет”, г. Воронеж, Россия, irina.korchagina89@mail.ru

Резюме. В настоящее время экология городских территорий является актуальной проблемой. Структура микроорганизмов в почве зависит от уровня городской нагрузки зоны отдыха (селитебная, транспортная). Информационные параметры биоиндикации городских почв получены подсчетом количества азотобактера, повышается численность микромицетов и снижается общее количество бактериальных форм микроорганизмов. В городских почвах происходит нарушение таксономической и трофической структуры микробного сообщества в негативную сторону, что воздействует на здоровье городского населения.

Ключевые слова: микробиоиндикация, урбаноземы, азотобактер, урбоэкосистема.

Введение

Проблема экологии городских территорий приобретает в настоящее время все большую актуальность. С экологических позиций территорию города необходимо рассматривать как особую урбоэкосистему (УЭС), существующую за счет постоянного внешнего “возмущающего” воздействия человека. Интенсивность и разнообразие этого сложного воздействия во многом превышают темпы адаптации и устойчивость природной системы. УЭС характеризуется нарушенностью круговорота веществ, сокращением биоразнообразия как по составу, так и по структурно-функциональным характеристикам, накоплением патогенных микроорганизмов. Свойства городских почв (урбаноземов) являются индикатором условий жизни и здоровья человека в городе [1].

Целью работы являлось изучение структуры микробного сообщества урбаноземов в разных зонах Центрального района г. Воронежа для выявления информативных параметров биоиндикации.

Материалы и методы исследования

Пробы почвы отбирали в слое 10-20 см в разных городских зонах Центрального района г. Воронежа: рекреация (контроль), селитебная или зона жилой застройки и транспортная (3 метра от полотна оживленных автомагистралей). Всего проанализировано 10 проб дважды за сезон. Численность почвенных микроорганизмов определяли методом посева на агаризованных питательных средах. Аммонификаторы выделяли на среде бобово-пептонный агар (БПА), иммобилизаторы азота – на среде крахмалоаммиачный агар (КАА), грибы – на среде Чапека, подкисленной до pH 4,5. Содержание азотобактера в почве оценивали методом обрастания почвенных комочков. Для этого готовили почвенную пасту с добавлением 20% мела (для подавления роста грибов), раскладывали на поверхность агаризованной среды Эшби и подсчитывали количество комочков, обросших коричневыми слизистыми колониями азотобактера.

Результаты и обсуждение

Азотобактер – один из основных несимбиотических азотфиксаторов, который обогащает почву доступными для растений соединениями азота и играет важнейшую роль в круговороте азота [2]. Высокая численность в контроле характерна для чернозема. Численность азотобактера в УЭС прогрессивно снижалась по мере усиления антропогенной нагрузки, наименьший процент обрастания почвенных комочков выявлен в урбаноземах транспортной зоны. По-видимому, это связано с накоплением в почве выбросов автотранспорта, в том числе тяжелых металлов, углеводородов, бензопирена [1].

Общая численность микроорганизмов в урбаноземах снижалась в ряду рекреация-селитебная-транспортная зона, что соответствует уровню городской нагрузки (табл. 1).

Для оценки трофической структуры почвенной микрофлоры используют коэффициент иммобилизации азота (отношение численности бактерий на средах КАА и БПА). Этот показатель характеризует долю связанного в почве минерального азота, доступного для растений, и отражает напряженность круговорота азота в экосистеме [2]. Коэффициент иммобилизации азота в урбаноземах г. Воронежа снижался в 3 раза даже в почве селитебных зон (табл. 2).

Таблица 1.

Численность микроорганизмов в почве разных зон г. Воронежа.

Городская зона	Бактерии			Грибы, тыс. клеток/г почвы
	Азотобактер,%	Аммонификаторы, млн. клеток /г почвы	Иммобилизаторы азота, млн. клеток /г	
Контроль	96	3,6	3,5	47
Селитебная	72	1,2	0,37	20
Транспортная	40	0,9	0,33	12

Таблица 2.

Нарушение структуры микробного сообщества урбаноземов г. Воронежа

Городская зона	Таксономическая структура		Трофическая структура
	Грибы· 10^3/Бактерии МПА	Грибы·10^3/Бактерии КАА	К имм
Контроль	1,1	0,76	0,98
Селитебная	3,7	0,61	0,31
Транспортная	2,5	0,77	0,37

Кроме того, выявлены нарушения таксономической структуры микробного сообщества почвы. В 3-4 раза возрастает доля мицелиальных форм микроорганизмов, что вызывает опасения экологов и медиков. Известно, что в городских почвах возрастает встречаемость токсигенных, аллергенных и патогенных грибов [1].

Заключение

Таким образом, в почве крупного областного центра, расположенного на выщелоченном черноземе, нами обнаружены нарушения микробного сообщества. В УЭС нарушение структуры микробного сообщества возрастают в следующем ряду: рекреации < селитебные < транспортные зоны. В качестве наиболее информативных параметров микробиоиндикации нами предложены: численность бактерий-иммобилизаторов азота и грибов, а также доля обрастания почвенных комочков азотобактером.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Марфенина А.М.* Микромицеты во внешней среде города. – М.: Изд-во МГУ, 2003. – 150 с.

2. *Бабьева И.П., Зенова Г.М.* Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 248 с.

Korchagina I.V., Svistova I.D.

MICROBIOINDICATION OF URBAN SOIL OF VORONEZH CITY

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia, irina.korchagina89@mail.ru

Summary. The problem of ecology of the urban area is the urgent problem of today. Structure of soil microbial society depends on level of urban load in order recreation – seliteb – transport zone. Information parameters of bioindication of urban soil to be obtain were the quantity of *Azotobacter*, increasing micromycetes and decreasing bacterial forms of microorganisms. In urban soil it was shown taxonomic and trophic structure of microbial society change to negative infusing of health of urban population.

Key words: microbioindication, urban soil, *Azotobacter*, urban ecosystems.

УДК 579.87–579.222.2

Коршунова И.О.[1], *Егорова Д.О.*[1,2], *Плотникова Е.Г.*[1,2]

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ НА РОСТ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА *RHODOCOCCUS* SP. KT112-7B

[1]Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, npka@list.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, daryao@rambler.ru

Резюме. Использование биодеградативного потенциала микроорганизмов является наиболее эффективным и безопасным способом борьбы с токсичными органическими загрязнителями окружающей среды. Показана общая зависимость кинетических параметров роста штамма *Rhodococcus* sp. KT112-7B от концентрации NaCl в среде при культивировании на различных субстратах (триптон и дрожжевой экстракт; бифенил; бензоат натрия). Установлена способность штамма использовать в качестве единственного источника углерода и энергии труднодоступные субстраты при высокой минерализации среды.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, бифенил, бензойная кислота, хлорид натрия, культивирование.

Введение

Очистка окружающей среды от токсичных загрязнений является одной из приоритетных задач XXI века. Согласно Стокгольмской конвенции 2001 года полихлорированные бифенилы (ПХБ) внесены в список 12-ти опаснейших стойких органических загрязнителей (СОЗ) [1]. На сегодняшний день наиболее безопасным и эффективным способом борьбы с СОЗ является использование бактерий, способных к детоксикации ксенобиотиков [2]. Активность штаммов по отношению к ПХБ обусловливается наличием метаболических систем разложения незамещенного бифенила. Одним из ключевых интермедиатов пути разложения бифенила является бензойная кислота [3]. Бактерии, обитающие в загрязненных почвах, нередко вынуждены адаптироваться к воздействию экстремальных факторов окружающей среды, в частности, к засолению почвы. В литературе есть данные об ингибирующем действии повышенной минерализации среды на разложение поллютантов: высокая степень засоления ингибирует общие пути метаболизма углеводородов [4]. Цель настоящей работы – изучение физиологических характеристик штамма-деструктора *Rhodococcus* sp. KT112-7B в условиях различной осмолярности среды.

Материалы и методы исследования

Физиологические параметры (кинетику роста) штамма изучали в периодической культуре в среде Раймонда [5] в условиях различной солености среды (0 – 12% NaCl). Культуру (1.5Ч10^4 КОЕ/мл) высевали в колбы объемом 250 мл в 100-150 мл среды и помещали в термокачалку (+27°С, 150 об./мин.). В качестве единственного источника углерода и энергии использовали: (а) дрожжевой экстракт (0.5 г/л) и триптон (1 г/л); (б) бифенил (0.5 г/л); (в) бензоат натрия (0.5 г/л). Измерение оптической плотности культуры проводили на спектрофотометре BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 540 нм и толщине кюветы 10 мм. Расчет кинетических параметров проводили по стандартным формулам [6].

Результаты и обсуждение

У штамма KT112-7B при культивировании в среде Раймонда (объем 100 мл) с триптоном и дрожжевым экстрактом обнаружена способность расти при концентрациях NaCl от 0 до 10,5%. Установлена прямая корреляционная зависимость между повышением концентрации соли в среде и увеличением продолжительности лаг-фазы роста (от 0 ч при культивировании без NaCl, до 245 ч – при 10,5% NaCl). Величина максимальной оптической плотности при этом уменьшалась незначительно (с 2,08 ед. до 1,87 ед.). Скорость экспоненциального роста культуры (μ) составляла 0,06 – 0,12 ч$^{-1}$, время удвоения (t_d) 6,53 – 12,31 ч.

При культивировании в среде (объем 150 мл) с бифенилом отмечена корреляция между повышением концентрации NaCl (от 2 до 8%) и кинетическими параметрами культуры штамма: прямая – с длительностью лаг-фазы (30 – 477 ч) и временем удвоения (10.25 – 46.21 ч); обратная – с удельной скоростью роста (0.02 – 0.07 ч$^{-1}$) и максимальной оптической плотностью (1.38 – 1.13 ед.). Культивирование при 0 и 1% NaCl показало одинаковое время подготовительной (24 ч) и экспоненциальной (76 ч) фаз роста, а так же сопоставимые значения остальных кинетических параметров штамма KT112-7B.

При росте в среде (объем 150 мл) с бензоатом натрия без NaCl и с содержанием небольших концентраций соли (до 3% NaCl) время лаг-фазы составляло 30 ч. Дальнейшее увеличение концентрации NaCl (до 7,5%) приводило к увеличению длительности подготовительной фазы (от 72 до 119 ч). Максимальная оптическая плотность культуры составляла 0,46 – 0,60 ед., скорость экспоненциального роста культуры и время удвоения 0,06 – 0,18 ч$^{-1}$ и 3,77 – 10,85 ч, соответственно.

Заключение

В результате проведенных исследований показана зависимость кинетических параметров штамма *Rhodococcus* sp. KT112-7B от концентрации NaCl: увеличение длительности лаг-фазы культуры и снижение удельной скорости роста в экспоненциальной фазе при повышении концентрации соли в среде культивирования. В то же время, следует отметить, что штамм KT112-7B достигает значительной величины оптической плотности культуры при росте на исследованных субстратах при высоком уровне минерализации среды. На основании полученных данных можно сделать заключение, что штамм *Rhodococcus* sp. KT112-7B обладает метаболическими системами деструкции бифенила и бензойной кислоты, (которые, как известно, могут участвовать в разложении ПХБ), способными работать в присутствии высоких концентраций соли, что делает его перспективным для применения в биотехнологиях очистки окружающей среды от токсичных соединений в условиях засоления.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-96028р_урал_а) и УрО РАН (грант № 10-4-ИП-161).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Seeger M., Pieper D.H.* Genetics of biphenyl biodegradation and cometabolism of PCBs // Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. – 2010. – P. 1180–1194.
2. *Хоменков В.Г., Шевелев В.Г., Загустина Н.А.*, Безбородов А.М., *Попов В.О.* Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биодеградации ксенобиотиков у микроорганизмов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44(2) – С. 133–152.
3. *Pieper D.H.* Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol.. – 2005 . – V. 67. – P. 170–191.
4. *Mille G., Almallah M., Bianchi M., Wambeke F. van, Bertrand J.C.* Effect of salinity on petroleum biodegradation // Fresenius J. Anal. Chem. – 1991. – V. 339. – P. 788–791.
5. *Розанова Е.П.* Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. – 1982. – Т. 51. – С. 324–348.
6. *Шлегель Г.* Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

Korshunova I.O.[1], *Egorova D.O.*[1,2], *Plotnikova E.G.*[1,2]

THE EFFECT OF SALINITY ON THE GROWTH OF THE STRAIN-DEGRADER *RHODOCOCCUS* SP. KT112-7B

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, npka@list.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, daryao@rambler.ru.

Summary. Application of microbial metabolism in bioremediation is the most effective and safe way to eliminate persistent organic pollutants (POPs) from the environment. Cultivation with different substrates (tryptone and yeast extract, biphenyl, benzoic acid) exhibited correlation between the kinetic parameters of *Rhodococcus* sp. KT112-7B and NaCl concentration in the medium. The ability of this strain to use hard-to-degrade substrates as a sole carbon and energy source in association with high salinity was described.

Key words: *Rhodococcus,* biphenyl, benzoic acid, NaCl, cultivation.

УДК: 631.466.1

Макарова Н.В., Марфенина О.Е., Иванова А.Е.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ МЕГАПОЛИСА (Г. МОСКВА)

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, г. Москва, Россия, tatowka_07@mail.ru

Резюме. Изучена сезонная динамика численности и состава микроскопических грибов в приземных слоях воздуха (0,2 и 1,5 м от поверхности) и почвах в микрорайонах г. Москвы разного времени застройки (6 и 40 лет) и типа эксплуатации (жилые кварталы, придорожная зона) и городских лесопарках. Наибольшая численность культивируемых грибов в воздухе (до 1500 КОЕ/м^3) выявлена летом в новом жилом микрорайоне. Прямым методом учета обнаружено существенно большее содержание грибов в воздушной пыли - до 400 тыс. КОЕ/м^3. Состав микроскопических грибов в воздухе и в почвах различался. Для почв характерно большее разнообразие, но меньшая численность потенциально патогенных грибов. В почвах их численность возрастала весной, в воздухе - в конце лета и осенью. Грибы, известные как аллергенные (преимущественно *Cladosporium* spp.) в воздухе доминировали осенью, особенно на территории нового микрорайона.

Ключевые слова: микроскопические грибы, городская среда, аэромикология, потенциально патогенные грибы.

Введение

Микобиота городских территорий отличается от зональной [1, 2]. В городах большинство исследований микроорганизмов воздуха проводится внутри помещений для оценки опасности для здоровья человека [1]. Однако не менее важным является анализ содержания и определение источников формирования микробных аэрозолей в наружной среде города. Целью данной работы было изучение микромицетов в приземных слоях воздуха г. Москвы и анализ возможных источников их пополнения.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили в 2007–2010 гг. в г. Москве, район Тушино, в жилых кварталах разного времени застройки (6 и 40 лет) и городских лесопарках с известными свойствами почв [2, 3]. Микоаэропланктон при удалении от автотрассы (0,5 м, 1,5 м, 3 м, 5 м) изучали в районе Раменки в 2011 г. Пробы воздуха отбирали с помощью аспиратора ПУ-1Б на высоте 0,2 м и 1,5 м на среду Чапека в 3-5-кратной повторности. Содержание грибных зачатков в пробах воздушной пыли оценивали также при люминесцентной микроскопии по окраске калькофлюором [4]. Микобиоту верхних горизонтов почв изучали методом посева почвенных разведений на среду Чапека в 5-кратной повторности. Структуру грибных комплексов описывали по показателям частоты встречаемости и обилия видов [4]. Видовую идентификацию осуществляли по культурально-морфологическим признакам, для стерильных форм – по анализу участков ITS1, ITS2 рДНК.

Результаты и обсуждение

Показано, что численность культивируемых грибных пропагул в городском воздухе изменялась в разные сезоны года: от высоких значений летом (около 1500 КОЕ/м^3) и осенью (в 2009 г. до 1100 КОЕ/м^3) до минимальных значений зимой (30-50 КОЕ/м^3). Наиболее высокие значения численности микромицетов в воздухе города – 1700 КОЕ/м^3 – были зафиксированы летом аномально жаркого и сухого 2010 года. Выявлено вертикальное распределение содержания грибных диаспор от максимума численности в приземном воздухе с уменьшением в 1,5-2,0 раза на высоте 1,5 м. Как правило, наибольшую численность культивируемых грибов в приземном слое воздуха (до 1500 КОЕ/м^3 летом) регистрировали на территории нового (6 лет) микрорайона. Эти значения втрое превышали допустимые концентрации в 500 КОЕ/м^3, рекомендуемые для помещений [5]. Прямым учетом методом люминисцентной микроскопии было обнаружено на 2 порядка большее содержание грибных диаспор в приземных слоях воздуха (до 400 тыс. КОЕ/м^3). То есть, количество грибной биомассы, поступающей к человеку при дыхании, может быть существенно выше, чем при оценке традиционными методами. Установлено, что в составе твердых частиц воздушной пыли, оседающей вдоль автодорог, грибные пропагулы составляли 10-12%, преобладали споры размером 2,5-5 мкм, численность пропагул снижалась по мере удаления от дороги.

При анализе сезонных изменений видового разнообразия микобиоты воздуха на исследованных участках всего было выделено 82 вида микроскопических грибов. Наибольшее разнообразие отмечено весной в лесопарке. Постоянным компонентом аэропланктона был вид *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, выявлено его доминирование по численности (до 1000 КОЕ/м^3) осенью, в новом микрорайоне и летом. В воздухе нового микрорайона сезонная динамика видового состава грибов была менее выражена, возрастало присутствие тёмноокрашенных видов.

При исследовании источников пополнения микробных аэрозолей в городе показано, что почвенная пыль - не основной источник. Кластерный анализ выявил отличие состава и структуры грибных комплексов воздуха от почвы. В почвах отмечено большее разнообразие потенциально патогенных грибов с максимумом их численности весной. В воздухе их было больше в конце лета и осенью. Осенью в воздухе увеличивалось и содержание темноокрашенных грибов, типичных на опаде. Возможно, поступление с поверхности растений вносит больший вклад в формирование воздушной микобиоты города.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11-04-00857а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Марфенина О.Е., Фомичева Г.М.* Потенциально патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции. // Микология сегодня. Т. 1. – М.: Национальная академия микологии, 2007. –С. 235–266.

2. *Иванова А.Е.*, *Марфенина О.Е.*, *Суханова И.И.* Функциональное разнообразие микроскопических грибов в городских почвах разного возраста формирования // Микология и фитопатология. –2008. – Т. 42. Вып. 5. -–С. 450–460.

3. *Строганова М.Н.*, *Мартыненко И.А.*, *Прокофьева Т.В.* Физико-химические и физико-механические свойства урбанизированных лесных почв. // Лесные экосистемы и урбанизация. –М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – С. 90–124.

4. Методы почвенной микробиологии и биохимии (Под ред. Д.Г.Звягинцева). – М.: Изд-во МГУ. – 1991. – 303 с.

5. Human Development Report 1990, Concept and Measurement of Human Development, World Health Organization (http://hdr.undp.org).

Makarova N.V., Marfenina O.E., Ivanova A.E.

MICROSCOPIC FUNGI IN THE AIR OF THE BIG CITY (MOSCOW)

Moscow State University, Moscow, Russia,

tatowka_07@mail.ru

Summary. It was studied the seasonal dynamics of the composition and abundance of microscopic fungi from the upper-soil air layers (0.2 and 1.5 m from the surface) and from the soils in residential districts of megapolis Moscow urban forest parks as control. Those residential districts were built at different time (6 and 40 years ago) and different uses (residential areas, roadside area). The highest number of cultivated fungal propagules in the air (up to 1500 CFU/m^3) was found in summer in the new district. The direct account of fungal propagules in the air dust detected significantly higher its content (up to 400 thousand CFU/m^3). The composition and structure of microscopic fungi in the air and soils were very different. In soils it was indicated a greater variety but smaller numbers of potentially pathogenic fungi in comparison with air. The highest content of opportunistic fungi recorded in soils - in the spring but in the air - in the late summer and autumn. Fungi knowing as allergenic (mainly *Cladosporium* spp.) dominate in air in the autumn especially at the new district.

Key words: microscopic fungi, urban area, air mycology, opportunistic fungi.

УДК 57.088.6+615.322

Мухутдинова А.Н.[1], Рычкова М.И.[1], Вихарева Е.В.[3], Ившина И.Б.[1,2]

РЕСПИРАТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ИЭГМ 767 ПРИ БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТАМИНОФЕНА

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, annamukhutdinova@yandex.ru, richkova@iegm.ru, ivshina@iegm.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия; [3]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермская государственная фармацевтическая академия”, г. Пермь, Россия

Резюме. Исследована респираторная активность клеток *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 767 с индуцированным оксигеназным ферментным комплексом при биотрансформации ацетаминофена ($C_8H_9NO_2$, CAS:103-90-2, N-(4-гидроксифенил)ацетамид, 4-ацетамидофенол, парацетамол) в виде фармацевтической субстанции и таблеток. Показано, что динамика дыхательной активности родококков характеризовалась стабильным потреблением O_2 и выделением CO_2 в течение всего срока наблюдения (72 ч). При этом скорости потребляемого кислорода и выделяемого углекислого газа были почти зеркальными отражениями друг друга. Наиболее высокие показатели интенсивности дыхания родококков (-4,8 –-6,6 (O_2) и 3,6–5,2 (CO_2) мкл/мин) и скорости биодеградации ацетаминофена в субстанции (3,5 мг/ч) и таблетках (6,0 мг/ч) регистрировались через 2,0–3,0 ч с начала эксперимента, что свидетельствовало о биодоступности субстрата. Последующее снижение скоростей респирации родококков и биодеструкции ацетаминофена коррелировало с синтезом и накоплением в среде инкубации *n*-аминофенола – первичного продукта метаболизма парацетамола. Наибольшая респираторная активность родококков обнаруживалась при использовании ацетаминофена в форме таблеток, что в 1,1 раз превышало таковую при использовании фармацевтической субстанции. Сделано предположение о том, что присутствие вспомогательных веществ в таблетках обусловливает повышенную каталитическую активность родококков в отношении ацетаминофена.

Ключевые слова: ацетаминофен, биодеградация, родококки, респираторная активность.

Введение

Респираторная активность (РА) – показатель жизнеспособности бактериальных клеток и интенсивности протекающих в них метаболических процессов [1, 2, 3]. В настоящей работе данный критерий использован при мониторинге процесса биодеструкции ацетаминофена ($C_8H_9NO_2$, CAS:103-90-2, N-(4-гидроксифенил)ацетамид, 4-ацетамидофенол) под воздействием родококков. Ацетаминофен (*син*. парацетамол) является наиболее часто и повсеместно используемым лекарственным препаратом в современной медицинской практике, обладающим жаропонижающим и анальгетическим действием. В европейских странах парацетамол продается свыше 1000 тонн в год [4]. Парацетамол все чаще и в относительно высоких концентрациях детектируется в окружающей среде [5]. Ранее был исследован большой массив чистых культур актинобактерий рода *Rhodococcus* на способность к биодеструкции парацетамола и отобраны активные штаммы родококков (*R. erythropolis* ИЭГМ 767, *R. ruber* ИЭГМ 77), обладающие деградирующей активностью по отношению к парацетамолу; определены кинетические параметры и особенности его биологической конверсии с использованием родококков [6]. Цель настоящей работы – исследование РА клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 767 в процессе биодеструкции ацетаминофена.

Материалы и методы исследования

Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 767 был выделен из нефштелама нефтяного месторождения (Пермский край, Россия) и поддерживается в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ (официальный акроним ИЭГМ, WFCC#768, www.iegm.ru/iegmcol). Культура способна использовать широкий спектр органических соединений (жидкие *н*-алканы, фенол, бензол, *о*-ксилол, бензойную кислоту) в качестве единственного источника углерода и энергии. Ацетаминофен использовали в виде субстанции (порошок производства Ирбитского химико-фармацевтического завода, Россия) в концентрации 0,2%, а также в форме таблеток (ЗАО “Медисорб”, г. Пермь, Россия), содержащих 0,2 г ацетаминофена и 10 % вспомогательных (поливинилпирролидон, стеариновая кислота, тальк, крахмал) веществ. Эксперименты проводили в стеклянных флаконах вместимостью 500 мл с объемом минеральной среды “RS” [6] 100 мл, содержащей 0,2% ацетаминофена при постоянном перемешивании (400 об/мин, T=29±2°C) на многоместной магнитной мешалке RT 10 (“Power IKAMAG”, Германия). Содержимое флаконов защищали от света светонепроницаемым материалом во избежание фотоокисления ацетаминофена. Инокулятом служили родококки (3,0x10^7кл/мл), предварительно выращенные в присутствии фенола (0,5 г/л). В качестве контролей использовали: (1) стерильный раствор ацетаминофена в среде “RS”, не инфицированный культурой (абиотический); (2) среда “RS” с клетками родококков без внесения ацетаминофена (биотический). Продолжительность экспериментов составляла 72 ч. РА родококков определяли с помощью 6-канального респирометра Columbus Micro-Oxymax® (“Columbus Instruments”, США), оценивая скорость дыхания (мкл/мин), а так же количество потребленного кислорода и углекислого газа (мкл) бактериальными клетками. Параметры РА регистрировали каждые 42 мин. Количественный анализ ацетаминофена осуществляли с помощью хроматографа модели HP-1090 (“Hewlett Packard”, США; колонка ZORBAX SB-C18, 4,6x250 мм, 5 μм). Содержание *n*-аминофенола определяли с использованием спектрофотометра Lambda EZ201 (“Perkin-Elmer”, США). Продукты биодеградации ацетаминофена идентифицировали методом ТСХ на пластинах с силикагелем 60 F_{254} (Merk, США) в системе хлороформ–этанол (8:2) по объёму. Метчиками служили водные растворы ацетоминофена, *n*-аминофенола, пирокатехина и гидрохинона (“Sigma”, США). Детектирование исследуемых веществ проводили при λ=254 нм, используя УФ-облучатель LG/58 (Россия).

Результаты и обсуждение

По нашим данным, динамика дыхательной активности родококков характеризовалась стабильным потреблением O_2 и выделением CO_2 в течение всего срока наблюдения (72 ч). При этом скорости потребляемого O_2 и выделяемого CO_2 были почти зеркальными отражениями друг друга. Как видно из рис. 1А, Б, что в процессе биодеградации ацетаминофена наблюдалось незначительное снижение скорости РА родококков в течение первого часа с начала эксперимента. При этом скорость выделения CO_2 несколько снижалась (с 2,0 до 1,8 мкл/мин) при использовании ацетаминофена в виде таблеток и до 1,2 мкл/мин – субстанции (рис. 1А), тогда как наблюдалось незначительное увеличение скорости потребления O_2 (рис. 1Б).

Данный этап эксперимента соответствовал адаптационному периоду родококков к используемому субстрату. Наиболее высокие показатели интенсивности дыхания родококков (-4,8 –-6,6 (O_2) и 3,6–5,2 (CO_2) мкл/мин) регистрировались через 2,0–3,0 ч с начала эксперимента, что свидетельствовало о биодоступности субстрата. Как видно из рис. 2, скорость биодеградации ацетаминофена в субстанции (3,5 мг/ч) и таблетках (6,0 мг/ч) в этот период наблюдения также была максимальной. В абиотическом контроле значения респирации и скорости биодеградации ацетаминофена были равны нулю, следовательно, процесс окисления ксенобиотика связан с каталитической активностью родококков.

Последующее снижение скоростей респирации родококков и биодеструкции ацетаминофена коррелировало с синтезом и накоплением в среде инкубации *n*-аминофенола – первичного продукта метаболизма ацетаминофена. Содержание *n*-аминофенола в инкубационной среде к 2 ч эксперимента составляло 2,0% и 20% при использовании ацетаминофена в виде субстанции и таблеток, соответственно (рис. 3). При этом концентрация ацетаминофена в среде оставалась еще на высоком уровне (98–82% при использовании субстанции и таблеток соответственно), другие продукты окисления ацетаминофена в среде не обнаруживались.

Образующийся *n*-аминофенол, по-видимому, ингибирует процессы размножения родококков, но не влияет на их каталитическую

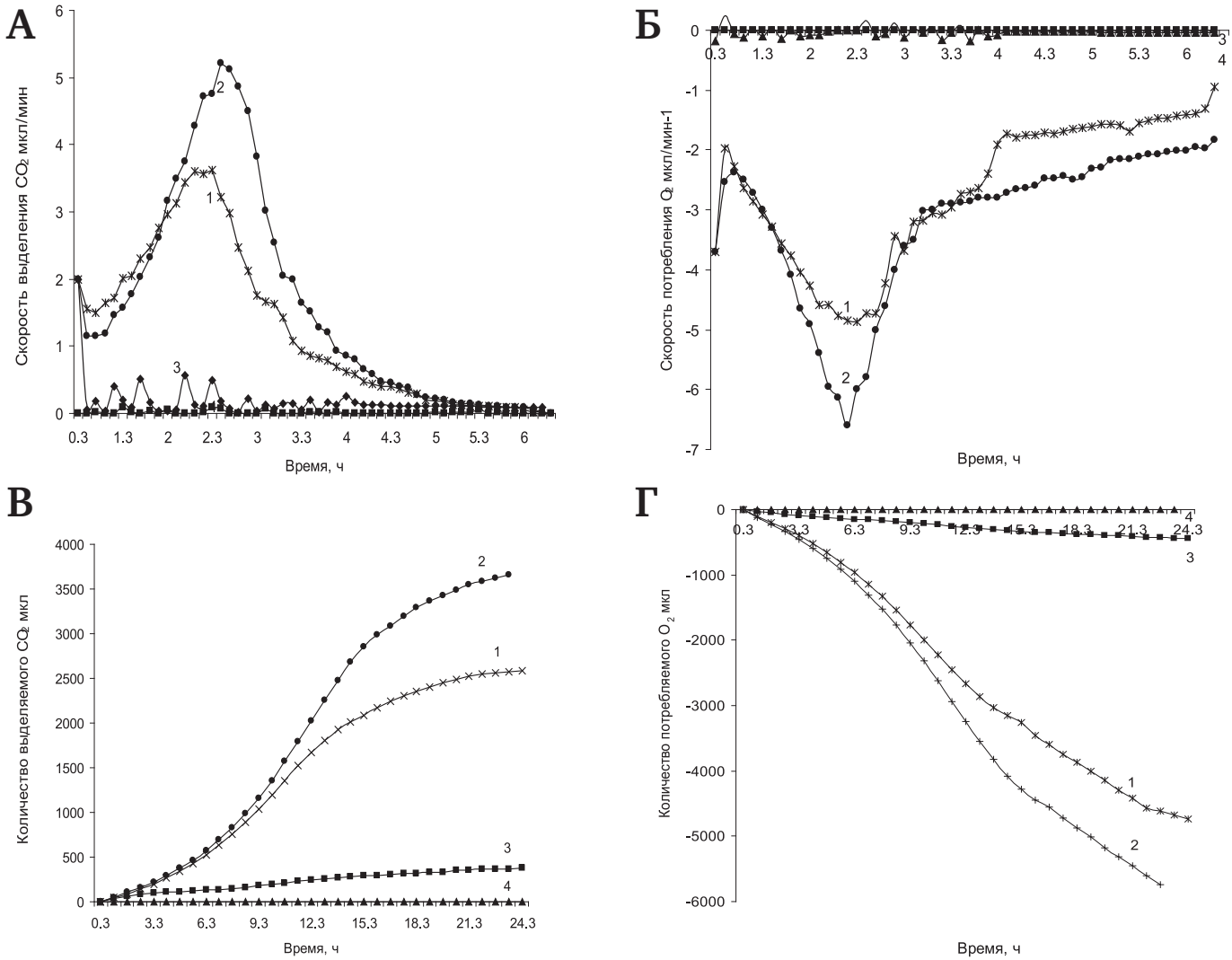


Рис. 1. Скорость РА (А, Б) и динамика выделения CO_2 и потребления O_2 (В, Г) в процессе биодеструкции ацетаминофена клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 767. 1– субстанция; 2 – таблетки; 3 – биотический контроль; 4 – абиотический контроль.

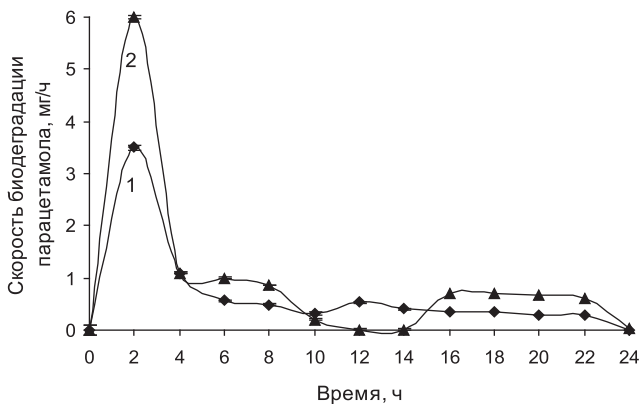


Рис. 2. Скорость биодеградации ацетаминофена в виде субстанции (1) и таблеток (2) клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 767.

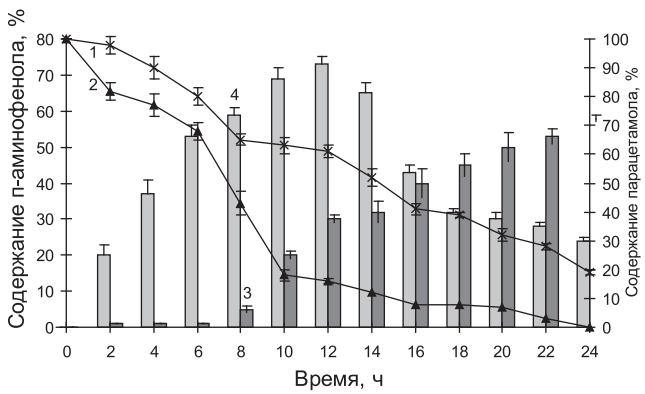


Рис. 3. Динамика содержания ацетаминофена (1, 2) и n-аминофенола (3, 4) в процессе биодеградации ацетаминофена в виде субстанции (1, 3) и таблеток (2, 4).

активность. Подтверждением этого является стабильное потребление O_2 и выделение CO_2 в течение всего срока эксперимента (см. рис. 1 В, Г).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что наибольшая РА родококков обнаруживалась при использовании ацетаминофена в форме таблеток, что в 1,1 раз превышало таковую при использовании фармацевтической субстанции. Это можно объяснить присутствием вспомогательных веществ в составе таблеток, которые могут являться дополнительными ростовыми субстратами для клеток родококков в процессе биодеструкции ацетаминофена.

Заключение

В результате проведенных исследований получено подтверждение возможности использования показателей РА в качестве индикаторов биохимической активности и жизнеспособности родококков в процессе биодеструкции ацетаминофена. Показано, что родококки обладают высокой РА в присутствии ацетаминофена в виде фармацевтической субстанции и таблеток, что свидетельствует о биодеградабельности данного ксенобиотика. Присутствие вспомогательных веществ в таблетках, очевидно, обусловливает повышенную каталитическую активность родококков в отношении ацетаминофена.

Работа поддержана грантами Президента РФ "Ведущие научные школы" НШ-64403.2010.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Биологическое разнообразие" (номер гос. регистрации 012.00963679) и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (государственный контракт № 16.518.11.7069).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Игнатов О.В., Гречкина Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В., Игнатов В.В.* Респираторная активность бактерии *Acinetobacter calcoaceticus* ТМ-31 при ассимиляции алкановых углеводородов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. – № 5. – Т. 36 – С. 555–558.

2. *Berdalet E., Packard T., Lagace B., Roy S., St-Amand L., Gagne J.* CO_2 production, O_2 consumption and isocitrate dehydrogenase in the marine bacterium *Vibrio natriegens* // Aquatic Microbial Ecology. – 1995. – V. 9. – P. 211–217.

3. *Steiniger C., Allerberger F., Gnaiger E.* Clinical significance of inhibition kinetics in *Streptococcus pyogenes* in response to penicillin // J. Antimicrob. Chemother. – 2002. – V. 50. N. 4. – P. 517–523.

4. *Estévez M.-C., Font H., Nichkova M., Salvador J.-P., Varela B., Sбnchez-Baeza F., Marco M.-P.* Immunochemical determination of pharmaceuticals and personal care products as emerging pollutans *//In:* The Handbook of Environmental Chemistry. – 2005. – V. 5. Part O. – P. 181–244.

5. *Ashton D., Hilton M., Thomas K.V.* Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom // Sci. Total Environ. – 2004. – V. 333. – P. 167–184.

6. *Ившина И.Б., Рычкова М.И., Вихарева Е.В., Чекрышкина Л.А., Мишенина И.И.* Алканотрофные родококки как катализаторы процесса биодеструкции не пригодных к использованию лекарственных средств // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – №. 4. – С. 443–447.

Mukhutdinova A.N.[1], Richkova M.I.[1], Vikhareva E.V.[3], Ivshina I.B.[1,2]

RESPIRATION ACTIVITY OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IEGM 767 IN ACETAMINOPHEN BIODEGRADATION

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru ; [2] Perm State National Research University, Perm, Russia; [3]Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

Summary. Respiration activity of *Rhodococcus erythropolis* IEGM 767 with an induced oxygenase complex was studied in biotransformation of acetaminophen ($C_8H_9NO_2$, CAS:103-90-2, N-(4-hydroxy phenyl)acetamide, 4-acetamidophenol, paracetamol) as a pharmaceutical substance and pills. The dynamics of *Rhodococcus* respiratory activity was characterized by stable O_2 consumption and CO_2 production over the observation period (72hrs). With that, the rate of oxygen consumed almost mirrored that of carbon dioxide produced. The highest rates (-4.8 – -6.6 (O_2) and 3.6–5.2 (CO_2) μL/min) of rhodococci respiration, and acetaminophen biodegradation as a substance (3.5 mg/h) and pills (6.0 mg/h) were registered after 2.0-3.0 hours of the experiment indicating the bioavailability of this substrate. Subsequent decrease in rhodococci respiration rate and acetaminophen biodegradation correlated with synthesis and accumulation of *n*-acetaminophen, primary product of paracetamol metabolism in the medium. The highest respiration activity of *Rhodococcus* cells was observed with acetaminophen pills, and it was 1.1 times higher than that with a pharmaceutical substance. It was supposed that an elevated catalytic activity of rhodococci was determined by the adjuvants present in pills.

Key words: acetaminophen, biodegradation, rhodococci, respiration activity

---

УДК 504.064

Новикова Л.В., Степанова Н.Ю., Фаттахов С.Г.

ДЕСТРУКЦИЯ НЕФТИ И ЕЁ ОСТАТОЧНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет", г. Казань, Россия, ljudmila_88@list.ru

Резюме. Было проведено изучение влияния биологически активного вещества мелафена на деструкцию и остаточную токсичность нефтепродуктов в донных отложениях. Показано, что наиболее эффективно процессы деструкции нефтепродуктов происходят в илистых донных отложениях, обогащенных органическим веществом, что приводит к ликвидации токсического эффекта на *Paramecium caudatum* и *Daphnia magna*, а также к значительному снижению токсичности в песчаных донных отложениях.

Ключевые слова: деструкция нефтепродуктов, донные отложения, токсичность.

Введение

В настоящее время расширяется использование биологически активных веществ для стимуляции процессов самоочищения от нефтяного загрязнения, преимуществом которых является их экологическая безопасность. Одним из таких препаратов является мелафен, зарекомендовавший себя как стимулятор процессов деструкции нефтепродуктов в почвах Западной Сибири [1].

Целью настоящей работы было оценить влияние биологически активного вещества мелафена на содержание и токсичность нефтепродуктов в донных отложениях в условиях лабораторного моделирования.

Материалы и методы исследования

В лабораторном моделировании использовали два типа стандартных донных отложений (ДО): песок, отобранный в экологически чистом районе, и смесь песка с илом (1:1). Внесение нефти (Ново-Суксинское месторождение Республики Татарстан) производили в соответствии с "Временным…" [2] в количестве 50 мл на 1 кг донных отложений. В качестве биологически активного вещества был выбран мелафен - гетероциклическое фосфорорганическое соединение, регулятор биохимических процессов, которое характеризуется токсикологической безопасностью, оказывает свое действие при чрезвычайно низких концентрациях – 10^{-6}-10^{-7} моль/л. В ходе предварительно проведенного эксперимента была установлена эффективная концентрация ($1\cdot10^{-4}$%) мелафена, при которой наблюдается максимальное снижение содержания нефтепродуктов в донных отложениях. Раствор мелафена использовали при отмывании замазученных нефтью донных отложений.

Определение нефтепродуктов осуществляли методом ИК-спектрометрии [3]. Тестирование проводили с использованием *Paramecium caudatum* Ehrenberg 1838 и *Daphnia magna* Straus 1820 в соответствии с "Временным…" [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических и непараметрических методов сравнения выборок по критериям Фишера, Стьюдента и Вилкоксона (парного).

Результаты и их обсуждение

Сравнение содержания нефтепродуктов в ДО разного типа показало, что внесение мелафена привело к интенсификации деструкции нефтепродуктов в илистых ДО на 22% по сравнению с песчаными и на 26% по сравнению с контрольным вариантом. В то же время, достоверного различия в содержании нефтепродуктов в контрольных вариантах без внесения мелафена (илистые ДО + нефть и песчаные ДО + нефть) не отмечено. Такая разница в наблюдаемом эффекте свидетельствует, по-видимому, о механизме действия мелафена - стимуляторе биохимических процессов деградации нефти, и в большей степени проявляется в случае с матрицей, обогащенной органическим веществом.

Результаты сравнения выборок непараметрическим методом парного критерия Вилкоксона по показателю "интенсивность деления" в опытах с использованием *Paramecium caudatum* в опытах с разными типами ДО показали достоверность отличий варианта с внесением мелафена в илистые ДО от контрольного варианта ($ДО_И$ + нефть) и варианта с внесением мелафена в песок ($ДО_П$ + нефть + мелафен). Интенсивность деления инфузорий в илистых ДО при

внесении мелафена не зависела от содержания нефтепродуктов. Напротив, отмечено, что при концентрации на уровне 5 г/кг наблюдается интенсификация клеточного деления. По-видимому, данная концентрация нефтепродуктов в ДО стимулирует развитие углеводородокисляющих бактерий и сапрофитной микрофлоры, увеличивая трофический потенциал инфузорий. В условиях ограниченности развития микрофлоры в песчаных ДО между интенсивностью деления инфузорий и содержанием нефтепродуктов наблюдается зависимость "доза-эффект", которая описывается уравнением $y=1{,}98x^2-32{,}57x+157{,}9$ ($R^2=0{,}97$).

Выживаемость дафний в илистых ДО с внесением мелафена была также выше по сравнению с песчаными. Для илистых ДО зависимость наблюдаемого эффекта от содержания нефтепродуктов описывается уравнением $y= -0{,}20x^2-0{,}93x+92{,}22$ (RI = 0,86). Для песчаных ДО при внесении мелафена наблюдается резкое снижение токсического эффекта при уменьшении содержания нефтепродуктов в соответствии с уравнением $y=1{,}47x^2-22{,}77\ x+90{,}42$ (RI = 0,84), а, начиная с концентрации 7 г/кг и более, наблюдается увеличение выживаемости. Такая инверсия, по-видимому, связана со снижением токсичности продуктов микробиологической деструкции нефтепродуктов. Деятельность аборигенной микрофлоры интенсифицируется при достижении вышеуказанной концентрации. Данный эффект, хоть и в меньшей степени, был отмечен и для инфузорий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Захарова К.А., Моисеев В.В., Шулаев М.В., Емельянов В.М.* Исследование биодеструкции нефтезагрязнений в подзолистых почвах Западной Сибири под воздействием препаратов "Мелафен" и "Fyre-Zyme" // Научный журнал Вестник Казанского ГАУ. – 2007. – № 1. – С. 60–65.

2. Временное методическое руководство по нормированию уровней содержания химических веществ в донных отложениях поверхностных водных объектов (на примере нефти). – М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002. – 138 с.

3. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектрометрии. – ФГУ ФЦАО, 2005. – 18 с.

Novikova L.V., Stepanova N.Yu., Fattakhov S.G.

DESTRUCTION AND TOXICITY OF OIL IN SEDIMENTS UNDER THE INFLUENCE OF BIOLOGICALY AKTIVE SUBSTANCE

Kazan Federal University, Kazan, Russia, ljudmila_88@list.ru

Summary. The use of the biologically active substance melaphen for treatment of oil polluted sediments led to decreasing the oil content especially in silt sediments with enriched organic matrix. It was shown that the processes of oil products destruction were accompanied with liquidation of toxic effects on infusoria *Paramecium caudatum* and crustacean *Daphnia magna*.

Key words: destruction of oil products, sediments, toxicity

УДК 57.088.6 – 615.322

Серебренникова М.К.[1], Куюкина М.С.[1,2], Ившина И.Б.[1,2], Шашерина А.Н.[3], Осипенко М.А.[3]

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ИММОБИЛИЗАЦИИ РОДОКОККОВ В КОЛОНОЧНОМ БИОРЕАКТОРЕ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, kuyukina@iegm.ru; [2]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет", г. Пермь, Россия, ivshina@iegm.ru; [3]Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования "Пермский национальный исследовательский политехнический университет", г. Пермь, Россия, oma@theormech.pstu.ac.ru

Резюме. Построена математическая модель процесса иммобилизации актинобактерий рода *Rhodococcus* на твердом носителе в колоночном биореакторе. Показано, что полученные в результате моделирования теоретические результаты согласуются с экспериментальными данными. Разработанная модель использована для оптимизации кинетических параметров процесса иммобилизации клеток *R. ruber* ИЭГМ 615 и *R. opacus* ИЭГМ 249 на гидрофобизованных хвойных опилках в биореакторе.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, иммобилизация, биореактор, математическое моделирование.

Одной из задач современной биотехнологии является интенсификация биологических процессов за счет усовершенствования оборудования и применения биокатализаторов (иммобилизованных клеток и ферментов). В настоящее время закрепленные на поверхности неподвижного носителя в биореакторе ("fluidized-bed bioreactor") целые клетки микроорганизмов широко применяются в различных областях биотехнологии. Такой подход позволяет предотвратить вынос микроорганизмов из биореактора, создавая условия для повышения концентрации активной биомассы и ее адаптации [1]. Достижение высокой численности иммобилизованных клеток и их прочное закрепление на поверхности носителя является необходимым условием для эффективной работы биореактора. Углеводородокисляющие актинобактерии рода *Rhodococcus*, способные расти в экстремальных условиях среды, на токсичных для многих микроорганизмов субстратах, синтезировать биосурфактанты и витамины [2], сегодня широко используются в биотехнологических процессах. В связи с этим актуальной проблемой представляется оптимизация процесса иммобилизации клеток родококков в условиях биореактора методами математического моделирования. Для описания закономерностей бактериальной адгезии широко используется физико-химический подход, основанный на законах классической термодинамики [3]. При этом ключевым кинетическим параметром в задачах по математическому моделированию процессов иммобилизации бактериальных клеток является скорость адгезии. Ранее нами было проведено экспериментальное исследование процесса иммобилизации клеток *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 615 и *Rhodococcus opacus* ИЭГМ 249 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM # 768; www.iegm.ru/iegmcol) на гидрофобизованных хвойных опилках в колоночном биореакторе [4]. Цель настоящей работы – построить математическую модель и определить кинетические параметры иммобилизационного процесса.

Экспериментальная установка и условия проведения процесса иммобилизации клеток родококков в биореакторе описаны в [4]. Суспензию клеток родококков ($2{,}0 \times 10^7$ кл/мл) с помощью перистальтического насоса подавали в колоночный биореактор (12,0 x 1,4 см), заполненный гидрофобизованными древесными опилками (2 г, d=1–3 мм). Биореактор может быть представлен в виде цилиндра с радиусом основания R и высотой H в котором находятся частицы носителя. Перистальтический насос прокачивает бактериальную суспензию клеток родококков по замкнутому контуру с заданной скоростью. Обозначим объемный расход клеточной суспензии через ϕ, а скорость движения жидкости в цилиндре – $v = \phi/(\pi R^2)$. В начальный момент все клетки находятся в свободном состоянии. Примем следующую схематичную модель процесса иммобилизации, учитывающую коадгезию клеток, но не учитывающую различие между обратимой и необратимой адгезией. В цилиндре с носителем для каждой свободной клетки может с некоторой вероятностью w_1 (час$^{-1}$) в единицу времени произойти адгезия с образованием нового кластера (состоящего из одной клетки). Также для каждой свободной клетки может с некоторой вероятностью w_2 (час$^{-1}$) в единицу времени произойти коадгезия к уже имеющемуся кластеру. Величина w_2 зависит от количества N клеток в этом кластере: $w_2(N)$. Для каждого кластера с некоторой вероятностью $w_3(N)$ (час$^{-1}$) в единицу времени может произойти десорбция с возвращением клеток в свободное состояние. Для функций $w_2(N)$ и $w_3(N)$ примем следующие выражения:

$$w_2(N) = w_{2\infty} + (w_{21} - w_{2\infty})\exp(-(N - 1)/N_*),$$

$$w_3(N) = w_{31}\exp(-(N - 1)/N_{**}).$$

В описанной модели зависимость от времени доли свободных клеток в суспензии (измеряемую экспериментально как величина оптической плотности $ОП_{600нм}$) можно численно найти методом Монте-Карло. Подбирая значения w_1, w_{21}, $w_{2\infty}$, w_{31}, N_*, N_{**}, можно достичь ка-

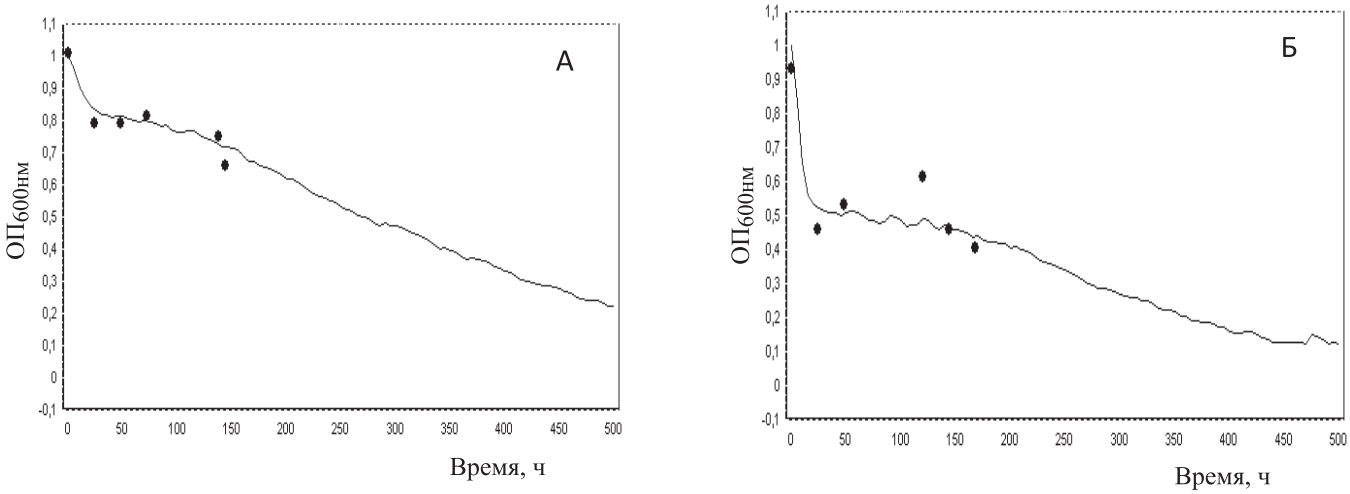


Рисунок. Экспериментальные зависимости (*точки*) и их теоретические аппроксимации (*линии*) процесса иммобилизации клеток родококков в колоночном биореакторе при скорости подачи бактериальной суспензии 0,68 (А) и 1,22 (Б) мл/мин.

чественного совпадения теории и эксперимента (рисунок). Как видно из рисунка, рассчитанные математическим путем значения показателя оптической плотности от времени совпадают с экспериментально полученными данными. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная модель адекватно описывает основные черты протекания иммобилизационного процесса.

Установленные на основании построенной модели временные зависимости концентрации свободных клеток родококков позволяют осуществлять подбор оптимальных кинетических параметров иммобилизационного процесса при заданных значениях скорости подачи бактериальной суспензии в биореактор. Разработанная модель допускает дальнейшее развитие, которое может заключаться в учете большего количества экспериментальных данных и в более детальном исследовании функций $w_2(N)$ и $w_3(N)$.

Исследование выполнено при поддержке грантов Президента РФ "Ведущие научные школы" НШ-64403.2010.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (номер гос. регистрации 01200963677) и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (государственный контракт № 16.518.11.7069).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Krivoruchko A.V., Podorozhko E.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I.* Petroleum-contaminated water treatment in fluidized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – V. 63. – P. 427–432.

2. *Ившина И.Б.* Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие) / Дис. …докт. биол. наук. – Пермь, 1997. – 197 с.

3. *Федорович В.В., Калюжный С.В., Ван дер Мирен П., Верстрает В.* Разработка феноменологической модели кинетики бактериальной адсорбции на низкоэнергетических поверхностях // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2002. – Т. 43. – № 6. – С. 417–419.

4. *Куюкина М.С., Ившина И.Б., Серебренникова М.К.* Оптимизация процесса иммобилизации клеток алканотрофных родококков на хвойных опилках в условиях колоночного биореактора // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2010. – Вып. 1. № 1. – С. 69–72.

Serebrennikova M.K.[1], Kuyukina M.S.[1,2], Ivshina I.B.[1,2], Shasherina A.N.[3], Osipenko M.A.[3]

MATHEMATICAL MODEL OF *RHODOCOCCUS* CELLS IMMOBILIZATION PROCESS IN A COLUMN BIOREACTOR

[1] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russia, kuyukina@iegm.ru; [2] Perm State University, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru; [3] State national research polytechnical university of Perm, Perm, Russia, oma@theormech.pstu.ac.ru

Summary. A mathematical model of the process of *Rhodococcus* bacteria immobilization in a bioreactor was developed. The theoretically calculated results were agreed with experimental data on immobilization of *Rhodococcus* cells in a bioreactor. Based on this model, optimal kinetic parameters of the immobilization process for *R. ruber* IEGM 615 и *R. opacus* IEGM 249 were determined.

Key words: *Rhodococcus*, immobilization, bioreactor, mathematical model.

УДК 579.222:547.36

Федорова А.А. [2], Коробов В.В. [1], Журенко Е.Ю. [1], Жарикова Н.В. [1], Ясаков Т.Р. [1], Анисимова Л.Г. [1], Маркушева Т.В. [1]

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА АССИМИЛЯЦИИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ *BACILLUS SUBTILIS* 16

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия;

[2]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования " Башкирский государственный университет ", г. Уфа, Россия, tvmark@anrb.ru

Резюме: Из образца почвенной микробиоты, подвергавшейся воздействию факторов нефтехимического производства, выделен новый природный штамм-деструктор 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). По анализу гена 16S рРНК культура отнесена к виду *Bacillus subtilis*. Установлены промежуточные метаболиты конверсии 2,4-Д.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, *Bacillus*, 2,4,5-Т.

К настоящему времени обнаружен ряд бактерий, способных метаболизировать 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). Описаны бактерии-деструкторы родов *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Halomonas*, *Nocardioides, Ralstonia*. Ряд деструкторов 2,4-Д выделен среди группы псевдомонад: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* и *Pseudomonas putida* [1, 2]. На примере указанных выше штаммов было выявлено существова-

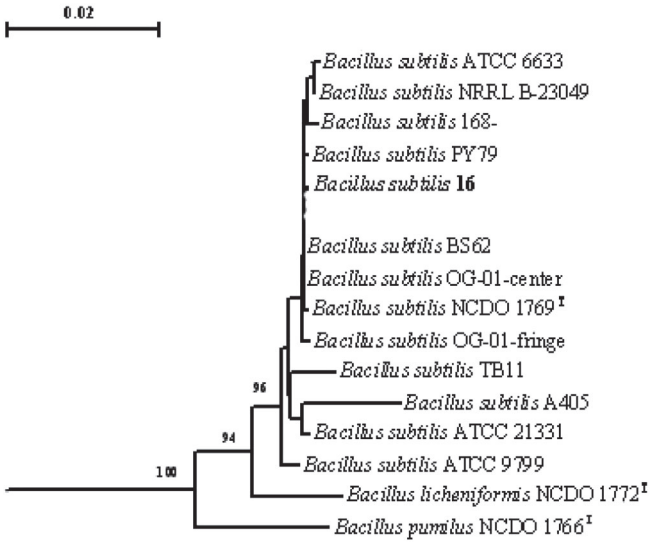


Рис. 1. Филогенетическое положение изучаемого штамма.
Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap" – анализа 100 альтернативных деревьев (значащими признаются значения больше 50).

ние генетического и биохимического разнообразия бактерий-деструкторов 2,4-Д. Вместе с тем обнаруживается недостаточно сведений об особенностях конверсии ксенобиотика у представителей рода *Bacillus* [3]. Целью настоящей работы было изучение нового штамма рода *Bacillus*, обладающего способностью к ассимиляции 2,4-Д.

Объектом исследований являлся штамм *Bacillus subtilis* 16, изолированный из сточных вод предприятий нефтехимического комплекса г. Уфы. Культивирование штамма осуществляли на синтетической питательной среде с 2,4-Д как единственным источником углерода и энергии. Определение 2,4-Д и ее интермедиатов проводили с использованием модифицированного метода определения микроколичеств пестицидов [4]. Амплификацию последовательности гена 16S рРНК осуществляли с использованием универсальной праймерной системы.

Видовая принадлежность штамма была определена на основе анализа последовательности гена 16S рРНК (рис. 1). В данной подгруппе штамм входил в филогенетический кластер, образованный штаммами вида *B. subtilis*, включающими и типовой штамм этого вида с уровнем 98.3-99.9%, который соответствовал внутривидовому уровню для данного вида (98.3-100%).

Из рис. 2 видно, что при культивировании штамма на среде с 2,4-Д, количество субстрата к 17-м сут снижалось на 80% от контроля. Таким образом, *B. subtilis* 16 способен использовать 2,4-Д в качестве единственного источника углерода и энергии.

Методом хромато-масс-спектрометрии были идентифицированы некоторые промежуточные продукты метаболизма 2,4-Д в среде культивирования. Среди интермедиатов были обнаружены: 5-окси-2,4-дихлорфеноксиуксусная и 2,3-дихлорфеноксиуксусная кислоты.

Строение интермедиатов позволяет полагать, что штамм осуществлял гидроксилирование молекул 2,4-Д, которое сопровождалось миграцией иона хлора с последующим его отщеплением.

Следует отметить, что к настоящему времени довольно подробно изучена конверсия 2,4-Д, которая начинается с разрыва эфирной связи и образования 2,4-дихлорфенола. Далее следуют этап окисления до соответствующего дихлоркатехола, раскрытие ароматического кольца с образованием *цис, цис*-2,4-дихлормуконовой кислоты с дальнейшим ее превращением в сукцинат через стадию образования хлормалеилацетата [3]. Таким образом, дехлорирование ароматического кольца осуществляется до его разрыва. В то же время известен штамм *Azotobacter chroococcum*, осуществляющий частичное дехлорирование на ранних стадиях метаболизма 2,4-Д [3].

В результате работы показано, что штамм *B. subtilis* 16 реализует оригинальные реакции конверсия 2,4-Д.

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов".

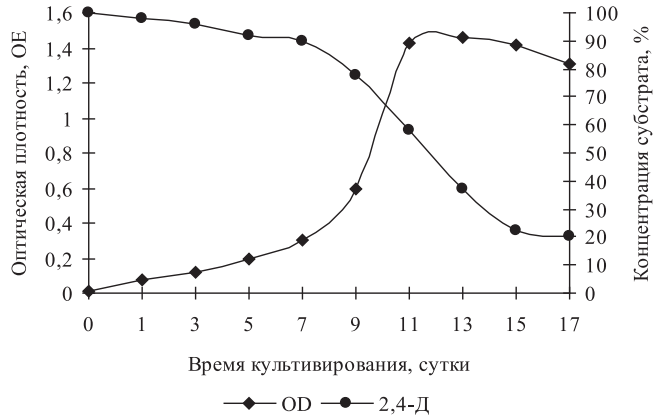


Рис.2. Зависимость значений оптической плотности клеточной суспензии OD590 от времени инкубации штамма *B. subtilis* 16 и динамика содержания 2,4-Д в среде культивирования.

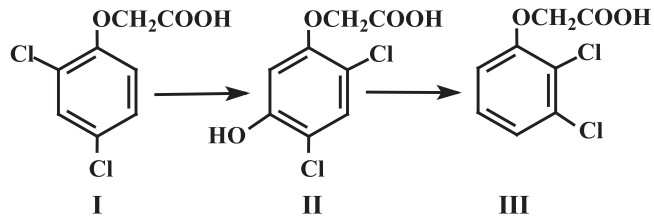


Схема 1. Этапы метаболизма 2,4 -Д *B. subtilis* 16. Условные обозначения: I -2,4-Д; II - 5-окси-2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; III - 2,3-дихлорфеноксиуксусная кислота

ЛИТЕРАТУРА

1. *Головлева Л.А., Перцова Р.Н.* Полное разложение и дехлорирование 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты штаммом *Nocardioides simplex* 3E // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 314. – № 4. – С. 981-983.

2. *Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А.* Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья // Экология. – 2006. – № 4. – С. 261-268.

3. *Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В.* Бактерии–деструкторы фенола и его хлорированных производных. – Уфа: Гилем, 2002. – 108 с.

4. *Клисенко М.А.* Методы определения микроколичеств пестицидов. – М.: Медицина, 1984. – С. 201-219.

Fedorova A.A., Korobov V.V., Zhurenko E.Y., Zharikova N.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Markusheva T.V.

CHARACTERIZATION OF THE PROCESS OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID ASSIMILATION *BACILLUS SUBTILIS* 16

Institute of biology of the Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa, Russia, tvmark@anrb.ru

Summary. The strain-destructor 2,4-dichlorophenoxyacetic acid have been isolated from contaminated soil. According to the results of 16S rDNA phylogenetic analyses the strain was identified as *Bacillus subtilis*. The metabolites of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation have been investigated.

Key words: *Bacillus*, bacteria-destruction, dichlorophenoxyacetic acid.

УДК 631.42

Шафигуллин Б.У., Галицкая П.Ю., Мамаева Е.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРОВ ДЕГРАДАЦИИ ПОЧВ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, г. Казань, Россия, gpolina33@yandex.ru

Резюме. Проведена оценка микробной биомассы и респираторной активности почв на пробных площадках, имитирующих основные типы деградации почв: склоновую эрозию, распашку, загрязнение нефтепродуктами, пестицидами, тяжелыми металлами. Показано, что микробная биомасса является более чувствительным индикатором состояния почв пробных площадок, чем респираторная активность.

Ключевые слова: деградация почв, микробная биомасса, респираторная активность почв, оценка качества почв

Оценка качества почв и степени их деградированности является крайне важной задачей. Несмотря на большое количество публикаций [1] и действующую в РФ методику по оценке степени деградированности почв [2], до сих пор не выработано подхода, который бы позволял оценить начальные стадии деградации. В последнее время для такой оценки все чаще применяются биологические методы, в т.ч. основанные на использовании микроорганизмов. Целью данной работы явилась оценка влияния 5 наиболее распространенных типов деградированности (склоновая эрозия, распашка, загрязнение металлами, пестицидами, нефтепродуктами) на микробную биомассу и респираторную активность почв. Работа проводилась в условиях полевого эксперимента: было заложено 7 опытных и 1 контрольная площадка вдоль склона (размер площадки – 1х10м). На площадках были смоделированы следующие типы деградации почв: 2 площадки были загрязнены инскетицидом “Молния” в 5-кратной дозе, 2 другие площадки были искусственно загрязнены смесью металлов (Cd, Cu, Zn, Pb), концентрации которых превышали ПДК в 10 раз. На третьей паре площадок был сымитирован разлив товарной нефти. Четвертая пара площадок не загрязнялась. Каждая вторая площадка была вскопана для имитации процессов эрозии сельскохозяйственных территорий (далее – “паханные почвы”, “П”; невскопанные площадки далее обозначаются “Н”). Пробы отбирали через 2 недели после внесения токсикантов в верхней и нижней части каждой из площадок с использованием почвенного бура.

На первом этапе работы была определена респираторная активность почв. Обнаружено, что данный показатель в верхней

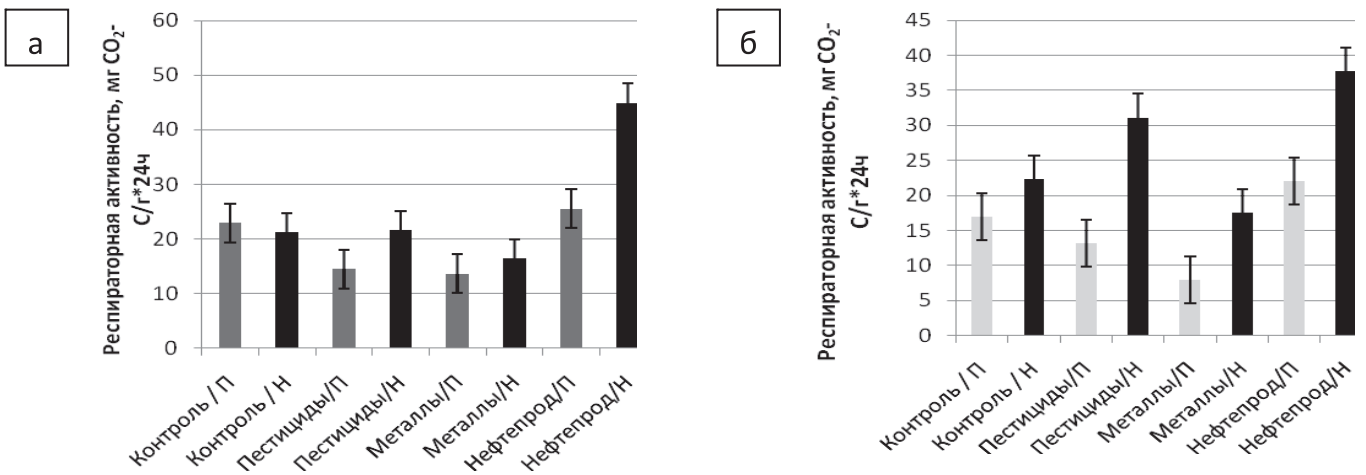


Рис.1. Респираторная активность в почвенных образцах верхней (а) и нижней (б) частях площадок

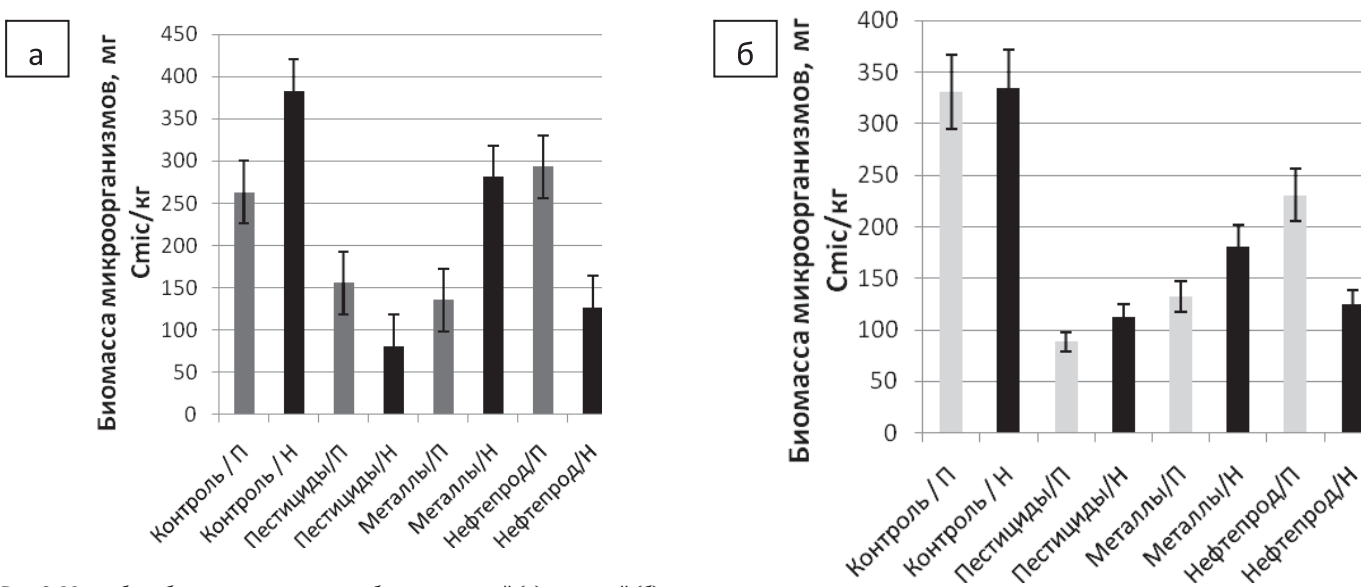


Рис. 2. Микробная биомасса в почвенных образцах верхней (а) и нижней (б) частях площадок

части площадок колеблется в пределах 13,6-44,9 мг CO_2-С/г*24ч, в образцах нижней части – 7,9-37,7 мг CO_2-С/г*24ч. Контрольное значение показателя (в верхней части площадки, непаханая почва) равно 21,2 мг CO_2-С/г*24ч. Наибольшее негативное воздействие на респираторную активность почв оказывают тяжелые металлы и пестициды. Присутствие нефтепродуктов стимулирует почвенное дыхание, особенно на невскопанной площадке.

Далее нами была оценена микробная биомасса почвенных образцов. Как видно на рис. 2, в почвенных образцах верхней части площадок она составила 81-383 мг Cmic/кг, в почвенных образцах нижней части – 88-335 Cmic/кг. Значение контроля (в верхней части площадки, непаханая почва) – 383 мг Cmic/кг. Необходимо отметить, что микробная биомасса оказалась более чувствительным показателем по отношению ко всем типам деградированности: так, в верхней части контрольной площадки уровень биомассы микроорганизмов в паханой почве был достоверно ниже, чем в непаханой. Это, вероятно, связано с тем, что часть органического вещества и микроорганизмов смывались. В нижней части склона таких различий между контрольными площадками не наблюдалось, т.к. процессы смыва замедлялись в связи с уменьшением угла наклона. Наименьшие значения уровня микробной биомассы, как в верхней, так и в нижней части склона, наблюдались на площадках, загрязненных пестицидом. В отличие от респираторной активности, ни на одной из площадок не наблюдалось увеличения уровня микробной биомассы по сравнению с контролем.

Таким образом, микробная биомасса оказалась более чувствительным индикатором при оценке состояния почв пробных площадок. Этот показатель целесообразно в дальнейшем использовать при интегральной оценке качества почв.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013гг".

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gomez J.A., Alvarez S., Soriano M.A.* Development of a soil gedradation assessment tool for organic olive groves in southern Spain // Catena. – 2009. – V.79. – P. 9-17.

2. Письмо Комитета РФ по земельным ресурсам и землеустройству от 29 июля 1994 г. № 3-14-2/1139 "О методике определения размеров ущерба от деградации почв и земель".

Shafigullin B.U., Galitskaya P.Yu., Mamaeva E.V.

USE OF MICROORGANISMS AS INDICATORS OF SOIL DEFRADATION

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia,

gpolina33@yandex.ru

Summary. Estimation of microbial biomass and respiration activity of soil samples from experimental plots, which imitate the main types of degradation (slope erosion, ploughing, oil, pesticides and heavy metal pollution) was carried out. It was demonstrated, that microbial biomass was more sensitive indicator of soil quality than respiration activity for analyzed soil samples.

Key words: soil degradation, microbial biomass, soil respiration activity, estimation of soil quality.

УДК 631.46: 632.122.2

Шестакова Е.А.[1], Назаров А.В.[1], Ананьина Л.Н.[1], Бороникова С.В.[2]

ВЛИЯНИЕ КЛЕВЕРА И ОВСЯНИЦЫ НА ОЧИСТКУ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ УГЛЕВОДОРОДАМИ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, sheanton@mail.ru; nazarov@iegm.ru; [2]Естественно-научный институт при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет", г. Пермь, Россия

Резюме. Исследовано воздействие растений видов клевер луговой (*Trifolium pratense L.*) и овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.) на разложение в почве фенантрена и октадекана, а также на численность и таксономический состав бактерий-деструкторов. Показана зависимость воздействия растений на деструкцию углеводородов микроорганизмами от биомассы корней в почве, это объясняет противоречивость сведений, встречающихся в литературе.

Ключевые слова: фиторемедиация, ризосфера, углеводороды, бактерии-деструкторы.

Введение

Фиторемедиация – применение растений для очистки загрязненных экосистем получает в настоящее время все большее развитие и применение. Однако, несмотря на большое количество работ, не решен вопрос о степени влияния растений на микробиологическую деструкцию гидрофобных ксенобиотиков в почве. Имеются данные как о высоком положительном эффекте [1, 2], так и об отсутствии влияния или даже отрицательном воздействии микробно-растительных систем на их разложение в почве [3, 4].

Для решения данной проблемы исследовали влияние разного количества растений в почве на деструкцию в ней углеводородов фенантрена и *н*-октадекана, а также на качественный и количественный состав почвенных бактерий-деструкторов углеводородов.

Материалы и методы исследования

Растения видов клевер луговой (*Trifolium pratense L.*) и овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.) высаживали семисуточными проростками в количестве от 1 до 120 особей в расчете на 10 г почвы. Высадку растений производили в контейнеры со 100 г дерново-подзолистой почвы, растертой с углеводородами фенантреном и октадеканом в концентрации 0,1% каждого. Подсчет численности бактерий-деструкторов осуществляли чашечным методом на среде Раймонда с добавлением фенантрена или октадекана в количестве 0,1%. Анализ содержания углеводородов в почве производили в хлороформенных экстрактах хромато-масс-спектрометрическим методом прибором Agilent 6890N ("Agilent Technology", США). Для оценки таксономического положения бактериальных штаммов определяли нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL ("Applied Biosystems", США). Полученные нуклеотидные последовательности длинной около 800 пн были проанализированы с использованием программы Sequence Scanner v 1.0. Поиск гомологичных последовательностей производили по базе данных EzTaxon (http://www.eztaxon.org).

Результаты и обсуждение

Установлено, что растения по-разному влияли на скорость деструкции фенантрена и октадекана (см. рисунок). Скорость деструкции фенантрена повышалась с увеличением корневой биомассы в почве и была максимальна в ризосферной зоне растений, в ризосфере клевера она была больше, чем в почве без растений в 15,6 раза, в ризосфере овсяницы – в 12,1 раза. Скорость деструкции октадекана возрастала с увеличением корневой биомассы в почве в варианте с клевером до уровня 0,8–11,4 мг /10 г почвы и в варианте с овсяницей – до 2,5–16,3 мг /10 г почвы. В первом случае она была выше, чем в почве без растений в 2,2–2,5 раза, во втором – 2,3–3,0 раза. С дальнейшим увеличением биомассы корней растений происходило некоторое снижение скорости деструкции октадекана, в ризосфере она была выше, чем в почве без растений только в 1,5 раза.

С увеличением корневой биомассы повышалась численность бактерий-деструкторов углеводородов в почве. Максимальная численность бактерий-деструкторов *н*-октадекана наблюдалась

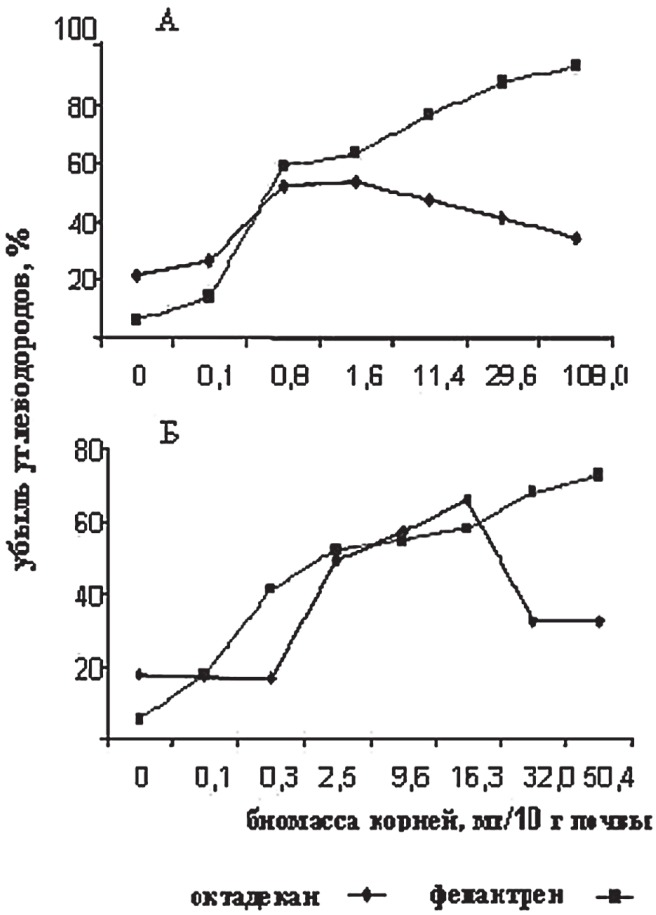


Рисунок. Влияние клевера лугового (А) и овсяницы луговой (Б) на деструкцию октадексана и фенантрена в почве

в ризосфере растений, так, в ризосфере клевера она была больше в 12,2 и в ризосфере овсяницы – в 10,8 раза, чем в почве без растений. А численность бактерий-деструкторов фенантрена – в 6,4 и 2,0 раза соответственно.

Наличие растений привело также к изменению преобладающих видов бактерий-деструкторов углеводородов. С увеличением корневой биомассы растений повышалась численность бактерий наиболее сходных по последовательности гена 16S рРНК с видами: *Xanthomonas melonis*, *Kaistia terrae* (в вариантах с высадкой клевера), *Acinetobacter gyllenbergii*, *Flavobacterium ginsenosidimutans, Brevundimonas bullata* (в вариантах с высадкой овсяницы), *Novosphingobium resinovorum* и видов рода *Pseudomonas* (во всех вариантах с высадкой растений). Уменьшалась численность бактерий наиболее сходных по последовательности гена 16S рРНК с видами: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter insolitus* и видов рода *Bacillus*.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что присутствие растений повышает численность бактерий-деструкторов углеводородов в загрязнённой почве, оказывает влияние на таксономический состав данных микроорганизмов. Выявлена зависимость влияния растений на деструкцию углеводородов микроорганизмами от биомассы корней в почве, что объясняет противоречивость сведений, встречающихся в литературе.

Работа поддержана "FP7 Cooperation Work Programme: Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnologies", Proposal No 266106 "BRIO".

ЛИТЕРАТУРА

1. Боронников В.Д., Шеховцов П.В., Шеховцов В.П. Способ ускоренной рекультивации почвы загрязненной нефтепродуктами. Патент на изобретение РФ 2066944. 1996.

2. Radwan S., Sorkhoh N., El-Nemr I. Oil biodegradation around roots // Nature. – 1995. – V. 376(27). – P. 302.

3. Günther T., Domberger U., Fritsche W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil // Chemosphere. – 1996. – V. 33(2). – P. 203–215.

4. Ke L., Wang W.Q., Wong T.W.Y., Wong Y.S. Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms // Chemosphere. – 2003. – V. 51. – P. 25–34.

Shestakova E.A.[1], *Nazarov A.V.*[1], *Anan'ina L.N.*[1], *Boronikova S.V.*[2]

EFFECT OF CLOVER AND FESCUE ON REMEDIATION OF HYDROCARBON-CONTAMINATED SOIL

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, sheanton@mail.ru; nazarov@iegm.ru;
[2]Natural Sciences Institute of Perm State National Research University, Perm, Russia

Summary. We investigated the effects of the plant species red clover (*Trifolium pratense L.*) and meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) on phenanthrene and octadecane decomposition in soil, as well as on the abundance and taxonomic composition of bacteria-destructors. The degree of positive effect of plants on degradation of hydrocarbons by microorganisms depended on the root biomass in soil.

Key words: phytoremediation, rhizosphere, hydrocarbons, bacteria-destructors.

УДК 579.222

Анохин Б.А.[1], Максимов А.Ю.[1,2], Демаков В.А.[1,2]

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЕГРАДАЦИИ *О*-ФТАЛАТА БАКТЕРИЯМИ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИМИ ФТАЛЕВЫЕ ЭФИРЫ

[1]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия, boris.anokhin@gmail.com; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия

Резюме. Изучена способность микроорганизмов, трансформирующих эфиры фталевой кислоты, усваивать *о*-фталат в качестве единственного источника углерода и энергии. Отобраны 2 наиболее активных штамма, утилизирующих *о*-фталат в концентрации 20 мМ. Обнаружено, что при росте на *о*-фталате для *Arthrobacter* sp. 20-14 оптимальная pH среды составляет 8,0, в то время как для *Rhodococcus ruber* П5-3М – 7,0.

Ключевые слова: биодеградация, *о*-фталат, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*.

Фталевая кислота и ее эфиры применяются в производстве красок, пластиков, косметических изделий и др. В результате повсеместного использования данных продуктов в окружающую среду поступают значительные количества отходов, содержащих фталевую кислоту и ее эфиры. Исходя из их мобильности в почвенных и водных средах, стойкости в пищевых цепях, токсичности для животных и человека, данные вещества регулярно описываются как приоритетные загрязнители биосферы [1]. Микробная деградация как принципиальный способ их детоксикации описана неоднократно. Однако зачастую важной проблемой применения биодеструкторов является накопление токсичных продуктов частичной деградации поллютантов. Так, фталевая кислота является ключевым интермедиатом в бактериальной деградации фталевых эфиров, и далеко не все микроорганизмы способны к дальнейшей ее утилизации. Целью настоящей работы явился отбор штаммов микроорганизмов, трансформирующих фталевые эфиры и способных утилизировать *о*-фталат, а также изучение динамики и оптимизация условий его деградации.

В работе использовали 23 штамма микроорганизмов, активно трансформирующих фталевые эфиры. Для отбора штаммов-деструкторов культуры выращивали в течение 96 ч при 30 °С на агаризованной минеральной среде N [2]. В качестве источника углерода и энергии добавляли 5 мМ (0,83 г/л) нейтрализованной фталевой кислоты (*о*-фталата). Микробную деградацию проводили в жидкой среде N с 20 мМ (3,32 г/л) *о*-фталата в течение 120 ч. Показатели роста культур определяли по оптической плотности среды при 600 нм (OD_{600}). Для определения влияния параметров среды на рост штаммов, утилизирующих *о*-фталат, культуры инкубировали в среде N с 20 мМ *о*-фталата при различных значениях pH (5,0-8,0) и концентрации NaCl (0-1,0 г/л). Остаточное содержание *о*-фталата в среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

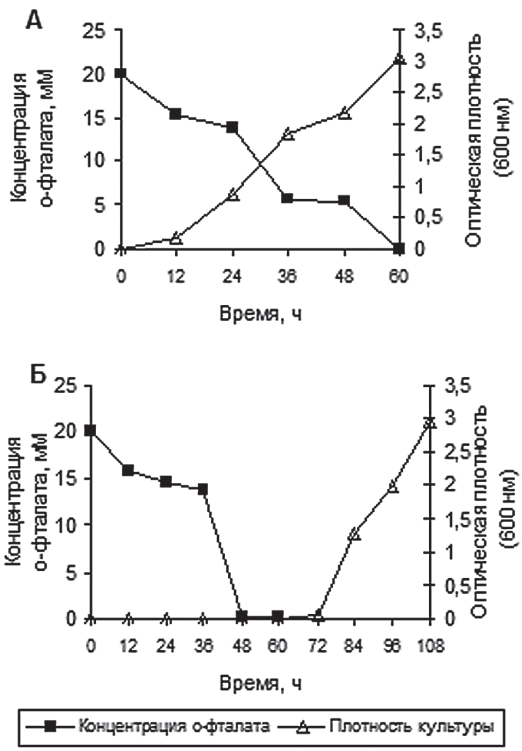


Рисунок. Динамика деградации *о*-фталата
А - *Arthrobacter sp.* 20-14. Б - *R. ruber* П5-3М

Таблица 1.

Рост штаммов 20-14 и П5-3М при различных параметрах среды.

№ п/п	pH	NaCl, г/л	Урожай (X), мг*/мл	
			20-14	П5-3М
1	5,0	0	0,87	0,52
2		0,5	1,39	0,35
3		1,0	1,05	0,69
4	6,0	0	30,45	17,06
5		0,5	23,32	14,62
6		1,0	29,58	17,23
7	7,0	0	42,46	40,89
8		0,5	35,84	36,02
9		1,0	40,03	33,76
10	8,0	0	19,77	32,71
11		0,5	36,72	28,88
12		1,0	49,07	33,23

* сухой вес

При высеве на агаризованную среду из 23 штаммов отобраны наиболее активно растущие на *о*-фталате культуры: *Arthrobacter* sp. 20-14 и *Rhodococcus ruber* П5-3М. При росте в жидкой среде N с 20 мМ *о*-фталата клетки *Arthrobacter* sp. 20-14 деградировали субстрат (до уровня 0,09 мМ) в течение первых 60 ч роста, что сопровождалось экспоненциальным увеличением OD_{600}. В ходе дальнейших 60 ч культивирования содержание *о*-фталата и плотность культуры не изменялись (рис. 1, А). В жидкой культуре *R. ruber* П5-3М в течение первых 36 ч наблюдалась медленная деградация субстрата (до 13,69 мМ), а в течение последующих 12 ч культивирования – практически полная деградация *о*-фталата (до 0,29 мМ). Однако активный рост культуры родококка начинался только после 60 ч, и максимальный показатель OD_{600} зафиксирован на 108 ч культивирования, при этом содержание *о*-фталата не менялось (рис. 1, Б). По-видимому, это связано с тем, что клетки штамма П5-3М в течение первых 48 ч инкубации трансформировали *о*-фталат, и накапливающийся продукт трансформации был использован затем в качестве ростового субстрата.

В результате исследования влияния параметров среды на рост исследуемых культур (табл. 1) установлено, что pH среды оказывает более существенное влияние на рост исследуемых культур, чем содержание NaCl (в используемых концентрациях 0-1,0 г/л). При этом *Arthrobacter* sp. 20-14 наиболее активно наращивал биомассу (X = 49,07 мг/мл) при pH 8,0. В культуре *R. ruber* П5-3М наибольший урожай клеток (X = 40,89 мг/мл) зафиксирован при pH 7,0.

Работа поддержана АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы 2009–2011 гг.” (проект 2.1.1/12133) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2013 гг.“ (2009-1.1-201-018).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Liu S.M.*, *Lin Y.L.*, *Chi W.C.* Shiu-Mei Liu. The effects of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate on biotransformation

of *o*-phthalate in sediment slurries under sulfate-reducing conditions // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2004. – V. 24. – P. 93–101.

2. *Максимов А.Ю.*, *Кузнецова М.В.*, *Овечкина Г.В.*, *Козлов С.В.*, *Максимова Ю.Г.*, *Демаков В.А.* Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 // Прикл. биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. № 1. – С. 63–68.

Anokhin B.A.[1], *Maksimov A.Yu.*[1,2], *Demakov V.A.*[1,2]

INVESTIGATION OF DYNAMICS AND OPTIMIZATION OF *O*-PHTHALATE DEGRADATION BY PHTHALATE ESTER-TRANSFORMING BACTERIA

[1] Perm State National Research University, Perm, Russia, boris.anokhin@gmail.com; [2] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of UB RAS, Perm, Russia

Summary. The possibility of phthalate esters transforming microorganisms to use *o*-phthalate as a sole carbon and energy source investigated. Two bacterial strains (*Arthrobacter* sp. 20-14 and *Rhodococcus ruber* P5-3M) degraded 20 mM *o*-phthalate. When grown in liquid media with different pH and NaCl concentration *Arthrobacter* sp. 20-14 got its maximal biomass under pH 8.0 while *Rhodococcus ruber* P5-3M under pH 7.0. The influence of NaCl concentration (0-1.0 g L^{-1}) on bacterial growth was of less significance.

Key words: biodegradation, *o*-phthalate, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*.

УДК 502.55

Бикташева Л.Р., *Зверева П.А.*, *Галицкая П.Ю.*

АНАЭРОБНОЕ ТЕРМОФИЛЬНОЕ СБРАЖИВАНИЕ СМЕСЕЙ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, г. Казань, Россия, BiktashevaL@mail.ru

Резюме. Антропогенная деятельность в современных условиях ведет к образованию огромного количества органических отходов, приносящих вред человеку и окружающей среде. В то же время эти отходы содержат органогенные элементы, которые при соответствующей обработке могут быть полезно использованы. В работе проанализирована возможность и эффективность анаэробной переработки муниципальных отходов. Восемь видов отходов были сброжены в термофильном режиме индивидуально и в смеси. Наибольший выход биогаза для индивидуальных субстратов был установлен для осадка сточных вод и отсева твердых бытовых отходов. Смешивание этих субстратов в отношении 10:1 приводило к увеличению выхода биогаза, при этом, начиная с 8 суток процесса сбраживания, метан в составе биогаза составлял 45-66%. Установлено, что ряд отходов (отходы жира, в частности), которые не сбраживаются индивидуально, могут быть переработаны в виде смесей.

Ключевые слова: отходы, анаэробное сбраживание, метан, биогаз.

Введение

Современный этап развития общества характеризуется размещением в окружающей среде огромного количества отходов, общий объем которых в мировом масштабе составляет около 5 млрд. $м^3$ в год. Около 60% массы отходов, образующихся в Республике Татарстан (РТ), имеет органическое происхождение. К данной группе относятся, в частности, отходы пищевых производств, отходы столовых и ресторанов, животноводства, растениеводства, коммунального хозяйства и т.д. В настоящее время практически единственным способом обращения с данными категориями отходов является их размещение на полигонах твердых бытовых отходов. В то же время принятая в Российской Федерации стратегия обращения с отходами, а также Директивы стран Европейского союза диктуют необходимость снижения поступления на полигоны органических отходов и недопустимость их поступления в необработанном виде. Предлагаемые пути переработки органической фракции отходов зависят от местных условий, качества образующихся отходов, однако предпочтение следует отдавать биотехнологическим процессам, в частности, анаэробному сбраживанию [1].

Биологическая переработка органических отходов нередко осложнена спецификой их химического состава. Решением проблемы может стать совместная переработка отходов различных производств, имеющих противоположные или дополняющие друг друга свойства. Цель настоящей работы – оценка возможности и эффективности совместного сбраживания органических отходов.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований определяли характеристики отобранных на предприятиях РТ отходов: осадка сточных вод (ОСВ), осадка сточных вод, обработанного в фильтр-прессе (ФП), отсева твердых бытовых отходов (отсев ТБО), куриного помета (КП), пищевых отходов (пищ), промасленных опилок (опилки), отработанного жира, консервов, потерявших потребительские свойства (конс). Установлено, что наибольшее содержание $C_{орг}$ наблюдается в промасленных опилках (80,7 мг/г сухого вещества). Наименьшее содержание $C_{орг}$ обнаружено в отсеве ТБО и курином помете (13,6 и 10,8 мг/г сухого вещества соответственно). Среди исследованных отходов наибольшее (4,9%) содержание общего азота отмечалось в курином помете. Значительно различались отобранные отходы по значению показателей pH и влажности. Так, для просроченных консервов pH составлял 4,5, для ОСВ – 7,9. Минимальное (1,34%) содержание воды обнаруживалось в отработанном жире, тогда как максимальную (96,18%) степень влажности выявляли в ОСВ. С учетом полученных данных об исходных характеристиках отходов были составлены соответствующие смеси. В качестве основы для смесей использовали ОСВ, отсев из ТБО и куриный помет. Остальные отходы использовали в качестве добавок и их примешивали к основным отходам в количестве 10-30%.

На следующем этапе работы проводили сбраживание исходных отходов и смесей на их основе. Сбраживание осуществляли в термофильном режиме при 55 ± 1^0C в течение 14 сут в лабораторных реакторах объемом 1 л. Загрузка реакторов – однократная. Среди исходных субстратов, сбраживаемых по отдельности, наибольший выход биогаза (в пересчете на сухое вещество) обнаружен в экспериментах с использованием отсева ТБО. Минимальный (0,6 мл/г сух. вещества) выход биогаза отмечен в экспериментах с использованием отработанного жира. Смеси разных отходов значительно различались между собой по объему выделяющегося биогаза. Обращает внимание тот факт, что для ряда токсичных промышленных отходов смешение с другими отходами приводило к увеличению выхода биогаза: так, при сбраживании промасленных опилок выделяется 1,13, а в их смеси с ОСВ – 13,25 мл биогаза/г сухого вещества, для отходов жироуловителей наблюдалась аналогичная закономерность – в смеси с ТБО объем выделяющегося газа увеличивался с 0,60 до 14,36 мл/г сухого вещества. Таким образом, отходы, которые практически не сбраживаются по отдельности, могут быть утилизированы в смеси с другими органическими субстратами.

В дальнейшем было осуществлено сбраживание ОСВ и смеси ОСВ и ТБО в 12-ти литровых реакторах с непрерывным перемешиванием в термофильном режиме. Сбраживание осуществляли в течение 21 сут. Установлено, что добавление 10% отсева из ТБО к ОСВ приводило к повышению степени эффективности сбраживания на 20%. Перемешивание обеспечивало значительное (в 2,4-3,7 раза) повышение выхода биогаза. Это, по-видимому, объясняется повышением биодоступности субстрата для микроорганизмов-деструкторов в результате разбивания комков, отсутствия застойных зон и т.д.

С точки зрения последующего использования биогаза как энергоносителя необходимо, чтобы в его составе в значительном количестве присутствовал метан. Поэтому в течение эксперимента в реакторах с перемешиванием было определено содержание в биогазе следующих веществ: CH_4, CO_2, O_2 и H_2S. Установлено, что на 3-и сут сбраживания содержание метана в биогазе достаточно низкое (18-22%), а содержание углекислого газа – напротив, высокое (46-49%). Это связано с тем, что в реакторах на первых этапах сбраживания еще присутствовал кислород, то есть процесс биодеструкции осуществляли аэробные микроорганизмы. На 8-е сут состав биогаза стабилизировался (количество метана составляло 45-66%) и практически не изменялся до 21 сут. По содержанию сероводорода в биогазе варианты опытов практически не различались между собой – на 3-и сут сбраживания концентрация H_2S составляла 2800, на 21-е сут – 710 ppm.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Khanal S.K.* Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications. – Ames: John Wiley & Sons, 2008. – 301 p.

Biktasheva L.R., Zvereva P.A., Galitskaya P.Yu.

ANAEROBIC TERMOPHYLIC DIGESTION OF ORGANIC WASTES MIXTURES

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia, BiktashevaL@mail.ru

Summary. A huge amount of organic wastes is produced during the human activity and causes negative effects on the environment. At the same time, these wastes contain the organic materials therefore they can be treated to get benefits. We tested the possibility and effectiveness of anaerobic digestion of municipal organic wastes. Eight types of wastes were digested individually and in mixtures under thermophilic conditions. The best results in terms of biogas yield were achieved in the digestion of sewage sludge and screening of municipal solid wastes as individual substrates. Mixing of these substrates in a ratio of 10:1 led to the increase in biogas yield. The analysis of biogas content showed that after 8 days of digestion the methane fraction of biogas was 45-66%. It was found that several wastes, e.g. grease wastes could not be digested individually, however, they could effectively be treated in mixtures.

Key words: wastes, anaerobic digestion, methane, biogas.

УДК 547.56:543.637.4+606

Боровкова И.С., Казаков Д.А., Вольхин В.В.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ФЕНОЛА В ПРИСУТСТВИИ АКТИВАТОРОВ МАССОПЕРЕНОСА O_2 ИЗ ГАЗОВОЙ ФАЗЫ В ВОДНУЮ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский национальный исследовательский политехнический университет”, г. Пермь, Россия, borovkova_irina_s@mail.ru

Резюме. Приведены результаты исследования влияния ионного состава водных растворов на эффективность действия активаторов межфазного переноса кислорода в процессе биокаталитического окисления фенола. Показано, что интенсивность массопереноса O_2 и, соответственно, скорость биокаталитического окисления фенола зависят преимущественно от природы анионов растворенных солей.

Ключевые слова: биокаталитическое окисление фенола, массоперенос кислорода.

Введение

Известно, что наиболее эффективным методом удаления фенола из сточных вод является их биологическая очистка, поскольку лишь она приводит к полной минерализации этого экотоксиканта [1]: фенол → пирокатехин → миконовая кислота → фумаровая кислота → цикл Кребса → CO_2 + H_2O.

Поскольку скорость биокаталитического окисления фенола определяется транспортом кислорода из газовой фазы в водную, повышение скорости процесса целесообразно достигнуть за счет использования активаторов межфазного переноса газов, позволяющих значительно повысить скорость процесса поступления кислорода в реакционное пространство без дополнительного потребления энергии в отличие от широко применяемого метода барботажа. Однако широкому практическому распространению активаторов межфазного транспорта кислорода препятствует малая изученность результатов их действия в растворах, содержащих разные компоненты. Это определило цель данной работы – исследовать эффективность активаторов в отношении межфазного переноса кислорода из газовой фазы в водные растворы разного состава (питательные среды для микроорганизмов) на примере биокаталитического окисления фенола.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная установка и методики исследования подробно описаны в [2]. В качестве активаторов межфазного переноса были выбраны тонкодисперсные твердые вещества, способные повышать значение объемного коэффициента массопереноса K_La кислорода в 2,3 раза. Для окисления фенола использовали консорциум микроорганизмов, выделенный из активного ила очистных сооружений ООО «ЛУКОЙЛ-Пермнефтеоргсинтез». В работе были использованы питательные среды, различающиеся по составу анионов солей [3]: среда 1 (KH_2PO_4 - 0,0125 М; $CaCl_2$ - 0,0003 М; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,002; $MgSO_4$ - 0,0017 М), среда 2 (в тех же концентрациях KH_2PO_4, $CaCl_2$, NH_4Cl, $MgCl_2$), среда 3 (KH_2PO_4, $CaCl_2$, NH_4NO_3, $Mg(NO_3)_2$).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы для каждого компонента питательных сред были экспериментально определены значения коэффициента K_La в присутствии активаторов межфазного переноса кислорода. Выяснилось, что с повышением концентрации растворов $(NH_4)_2SO_4$ и $MgSO_4$ от 0 до 0,02 М (рис. 1) величина объемного коэффициента массопереноса кислорода снизилась с 6,9 $ч^{-1}$ до 2,7 и 2,9 $ч^{-1}$, соответственно. Это явление объясняется тем, что в тонких пленках раствора на границе раздела фаз многозарядные анионы (в данном случае SO_4^{2-}) способны укреплять структуру воды, повышая вязкость раствора [4], что резко снижает скорость транспорта кислорода через границу газ-жидкость. Остальные компоненты питательных сред

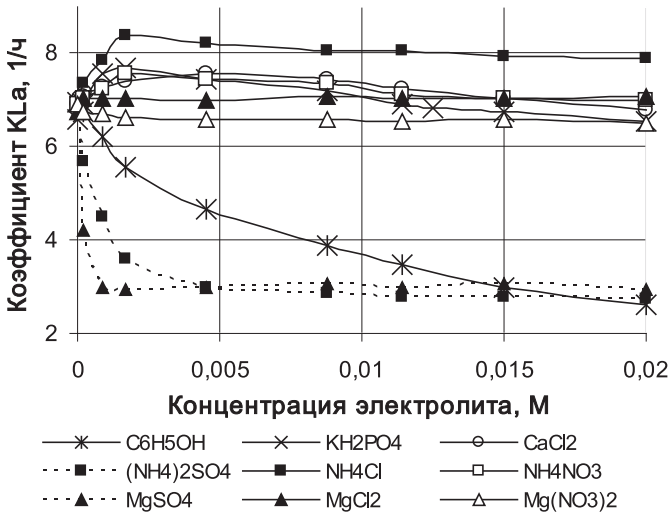


Рис. 1. Зависимость значений коэффициента K_La от концентрации электролитов.

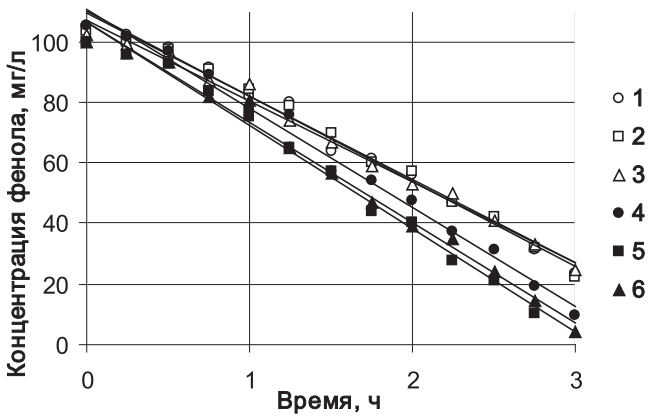


Рис. 2. Кинетические кривые процесса биоокисления фенола в отсутствии (1-3) и в присутствии активаторов межфазного переноса кислорода (4-6) на среде 1 (кривые 1, 4), на среде 2 (кривые 2, 5) и на среде 3 (кривые 3, 6).

(KH_2PO_4, $CaCl_2$, NH_4Cl, NH_4NO_3, $Mg(NO_3)_2$, $MgCl_2$) подобное влияние не проявляют. Так, при повышении концентрации раствора $CaCl_2$ с 0,1 до 4,5 мМ значение K_La не только не снизилась, но и возросло с 6,9 до 7,6 $ч^{-1}$. Положительный эффект выше других электролитов проявляет NH_4Cl.

Далее установлено, что с полученными значениями коэффициентов K_La коррелирует скорость процесса биокаталитического окисления фенола на фоне разных питательных сред. Так, при использовании сред 2 и 3, включающих в свой состав электролиты, в присут-

ствии которых происходит повышение значений коэффициента K_La (KH_2PO_4, $CaCl_2$, NH_4Cl, NH_4NO_3, $Mg(NO_3)_2$, $MgCl_2$), скорость процесса окисления фенола возросла примерно на 29 и 24%, соответственно. В то время как на среде 1, имеющей в своем составе электролиты, в присутствии которых происходит снижение величины K_La ($MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$), ускорение процесса под действием активатора произошло лишь на 16,5%.

Заключение

Таким образом, эффективностью процесса биокаталитического окисления фенола можно управлять за счет изменения ионного состава питательной среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сингирцев И.Н.*, *Волченко Е.В.* и др. Микробная деградация компонентов сточных вод производства фенола // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 2. – С. 178-188.

2. *Боровкова И.С.*, *Вольхин В.В.*, *Казаков Д.А.* Интенсификация биокаталитического окисления фенола активаторами межфазного переноса кислорода // Катализ в промышленности. – 2011. – № 2. – С. 66-73.

3. *Kilis N.K.* Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum* sp. isolated from industrial wastewaters // Int. Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – V. 63. – P. 778–781.

4. *Ziemenski S.A.*, *Whittemore R.C.* Behavior of gas bubbles in aqueous electrolyte solutions // Chem. Eng. Sci. – 1971. – V. 26. – P. 509.

Borovkova I.S., Kazakov D.A., Vol'khin V.V.

PHENOL BIOCATALYTIC OXIDATION IN THE PRESENCE OF OXYGEN MASS TRANSFER ACTIVATORS FROM THE GAS TO LIQUID

State National Research Polytechnical University of Perm, Perm, Russia, borovkova_irina_s@mail.ru

Summary. The study results of the solution ionic composition influence on the oxygen mass transfer activators efficiency at the process phenol biocatalytic oxidation are presented.

Key words: phenol biocatalytic oxidation, oxygen mass transfer.

УДК 664.162.036.4

Бузмакова Д. Ю.[1], Казьянин А.В.[1], Волкова Л. В.[2]

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОЛИЗА ДЛЯ БИОТРАНСФОРМАЦИИ БЕЛКОВ

[1]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермская государственная фармацевтическая академия" Минздравсоцразвития России, г. Пермь, Россия, giraff4ik@mail.ru; [2]Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский национальный исследовательский политехнический университет", г. Пермь, wolkowalw@mail.ru

Резюме. Эритромасса является одним из отходов фармацевтического производства, белковый компонент которой представлен гемоглобином. На его основе можно получать высокоэффективные метаболиты известного качественного аминокислотного состава с улучшенными свойствами. Ферментативное расщепление гемоглобина пепсином приводит к образованию субстанции пептидов средней и низкой молекулярной массы. В результате исследований при пепсиновом гидролизе эритромассы показано, что эритрогидролизат содержит пептиды низкой и средней молекулярной массы с преобладанием пептидов с Mr=6000 Da.

Ключевые слова: гидролиз, эритромасса, биологически активная субстанция.

Получение функциональных продуктов на основе не утилизируемых белковых отходов является перспективным направлением для предприятий фармацевтической промышленности. Кровь (человеческая и животная) и ее компоненты – наиболее ценный и дефицитный белковый субстрат, на основе которого изготавливают различные лекарственные препараты. Одним из отходов таких производств является эритромасса, белковый компонент которой представлен гемоглобином.

Принцип биотрансформации веществ в организме позволяет считать эритромассу таким субстратом, гидролиз которого допускает получение метаболитов, имеющих схожий с гемоглобином качественный аминокислотный состав. Белковая часть молекулы гемоглобина состоит из 574 аминокислотных остатков, в том числе содержит все незаменимые аминокислоты, кроме изолейцина. Гидролизаты полученные на основе гемоглобина, являются потенциальными источниками биологически активных веществ, в частности пептидов и биодоступного азота. В состав гемоглобина помимо четырех полипептидных цепей белка глобина входит небелковая часть – гем, в центре которой находится ион железа, придающий гемоглобину красную окраску. В организме глобин распадается на составляющие его аминокислоты, которые поступают в общий фонд свободных аминокислот печени и используются в соответствии с его потребностями. От гема отщепляется железо, а остающиеся пиррольные кольца образуют зеленый пигмент биливердин, который, окисляясь, превращается в билирубин – желтый пигмент, входящий в состав желчи.

Ферментативное разложение гемоглобина вне организма можно рассматривать как сложный процесс биотрансформации, предусматривающий деление белковых молекул глобина на пептидные фрагменты в щадящих условиях. Протеолитический фермент пепсин является представителем группы белков, которые осуществляют расщепление органических молекул с образованием пептидов средней и низкой молекулярной массы. Пепсин – не специфическая эндопетидаза, в результате действия которой на белковый субстрат образуются более короткие пептиды, но не свободные аминокислоты [1]. При действии на глобин пепсин в первую очередь гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами (фенилаланин, триптофан, тирозин) и несколько медленнее – лейцином и дикарбоновыми аминокислотами [2, 3].

На основе вышеизложенного нами предприняты попытки получения функциональных пептидных продуктов на основе эритроцитарной массы крови доноров. Отработана упрощенная технология пепсинового гидролиза гемоглобинсодержащего субстрата. По результатам ВЭЖХ, определен массовый состав субстанции: эритрогидролизат содержит пептиды низкой и средней молекулярной массы с преобладанием пептидов с Mr=6000 Da. Показано, что гидролизат обладает выраженным пролиферативным действием, а так же умеренной антибактериальной активностью.

Таким образом, ферментативное расщепление эритромассы – управляемый процесс, имеющий общие черты с физиологическим, в результате которого можно получить белковый гидролизат известного аминокислотного состава. Выбор протеолитических ферментов и оптимальных условий гидролиза играют немаловажную роль в процессе получения функциональных биологически активных продуктов с заданными свойствами. Поиск перспективных способов утилизации отходов дефицитного сырья особенно касается тех случаев, когда речь идет об освоении предприятиями фармацевтической промышленности собственных ресурсов в целях рентабельности и безотходности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Карелин А.А.*, *Филиппов М.М.*, *Яцкин О.Н.* Протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24. № 4. – С.271–281.

2. *Черняев С.И.*, *Люблинский С.Л.*, *Люблинская И.Н.*, *Марков М.В.* Гемобин – натуральная биологически активная пищевая добавка нового поколения // Пищевая пром-ть. – 2000. – № 6. – С. 50–52.

3. *Wei J.-T.*, *Chiang B.-H.* Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor // J. Sci. Food Agric. – 2009. – V. 89. – P. 372–378.

Buzmakova D.Y.[1], Kazjanin A.V.[1], Volkova L.V.[2]

PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATES OF KNOWN QUALITATIVE COMPOSITION

[1]Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia, giraff4ik@mail.ru; [2]State National Research Polytechnical University of Perm, Perm, Russia, wolkowalw@mail.ru

Summary. Erythromass is one of pharmaceutical production wastes, a protein component of which is represented by hemoglobin. According to the principle of physiological substance biotransformation, erythromass is a substrate that could be used for production of high-quality metabolites of the known amino acid composition, but with different properties. Enzymatic decomposition of hemoglobin by pepsin leads to the formation of medium- and low-molecular weight peptides. This produces a dark brown hydrolyzate due to the presence of heme-colored substances. Addition of excess active oxygen may be outside the body to affect the pigments which contribute to clarifying and improving the appearance of hemoglobin-based hydrolyzates. For example, in practice a peroxide-catalase method is widely applied to obtain food enrichers on the acid hydrolyzates basis of animal blood-formed elements. Thus, using the principles of physiological substances biotransformation, it is possible to obtain biologically active substances on a manufacturing scale of pharmaceutical production based on scarce raw materials with the aim to develop their own resources and the company profitability and wastelessness.

Key words: erythromass, hydrolysis, biologically active substance.

УДК 579.66

Васильев Д.М.[1], Максимова Ю.Г.[2], Демаков В.А.[1,2]

ДИНАМИКА ТРАНСФОРМАЦИИ 3-ЦИАНОПИРИДИНА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ И СВОБОДНЫМИ КЛЕТКАМИ *RHODOCOCCUS RUBER* GT1

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия, vasilyevdim@mail.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Россия, Пермь, maks@iegm.ru

Резюме. Изучена динамика трансформации 3-цианопиридина в никотинамид и никотиновую кислоту адсорбционно иммобилизованными и свободными клетками *Rhodococcus ruber* gt1. Установлено, что 200 мМ концентрация 3-цианопиридина является оптимальной для наиболее эффективного образования никотинамида. Нитрилгидратазная активность свободных клеток составляет 21, а иммобилизованных на носителе Урал ТМ-4 – 18 мкмоль/(мг·мин).

Ключевые слова: 3-цианопиридин, никотинамид, никотиновая кислота, конверсия, иммобилизованные клетки.

Введение

Ферментативная трансформация 3-цианопиридина в никотинамид и никотиновую кислоту с помощью нитрилгидратазы и амидазы бактерий является альтернативой энергозатратному химическому гидролизу [1]. Создание иммобилизованного биокатализатора на основе целых клеток нитрилгидролизующих бактерий позволяет решить проблему отделения продуктов от реакционной среды и снижения количества отходов в виде отработанной биомассы.

Целью данной работы явилось изучение динамики трансформации 3-цианопиридина в никотинамид и никотиновую кислоту адсорбционно иммобилизованными и свободными клетками *Rhodococcus ruber* gt1.

Материалы и методы исследования

Штамм *R. ruber* gt1 (ИЭГМ 612) выращивали до стационарной фазы роста на минимальной среде с 0,1% глюкозы и 10 мМ хлоридом аммония. Клетки иммобилизовали на карбонизированных углеродных вискозных волокнах Урал ТМ-4 в течение 24 ч. Реакцию трансформации 100-800 мМ растворов 3-цианопиридина проводили при 30°С в течение 2 ч, пробы отбирали через каждые 15 мин. Концентрацию субстрата и продуктов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC–10 “Shimadzu” (Япония) с колонкой С18 (250х4,6 мм), в качестве подвижной фазы использовали 10 мМ раствор KH_2PO_4 с 25% акрилонитрила, скорость потока составляла 0,5 мл/мин при 25°С.

Результаты и обсуждение

Изучена динамика трансформации растворов 3-цианопиридина свободными и иммобилизованными клетками. За 60 мин трансформации 200 мМ раствора 3-цианопиридина 3,6 мг свободных клеток происходит 97%-ная конверсия субстрата, остаточное количество которого в 10 мл пробы составляет 6,62 мг. При этом образуется 179,23 мг никотинамида и 5,85 мг никотиновой кислоты. При трансформации такого же количества субстрата иммобилизованными клетками (1,35 мг) полная конверсия субстрата за это время не наблюдается, и через 120 мин содержание 3-цианопиридина, никотинамида и никотиновой кислоты в пробе составляет 15,97; 160,68 и 4,81 мг соответственно (рисунок).

Подобная закономерность наблюдается и при конверсии 100 и 400 мМ растворов 3-цианопиридина. Полная конверсия 100 мМ раствора субстрата 4 мг свободных бактериальных клеток происходит за 45 мин, при этом количество цианопиридина, никотинамида и никотиновой кислоты в пробе составляет 1, 106,95 и 5,21 мг соответственно. Скорость трансформации субстрата иммобилизованными клетками (1,35 мг) существенно ниже, и после 120 мин реакции остается 11,45 мг цианопиридина, а содержание никотинамида и никотиновой кис-

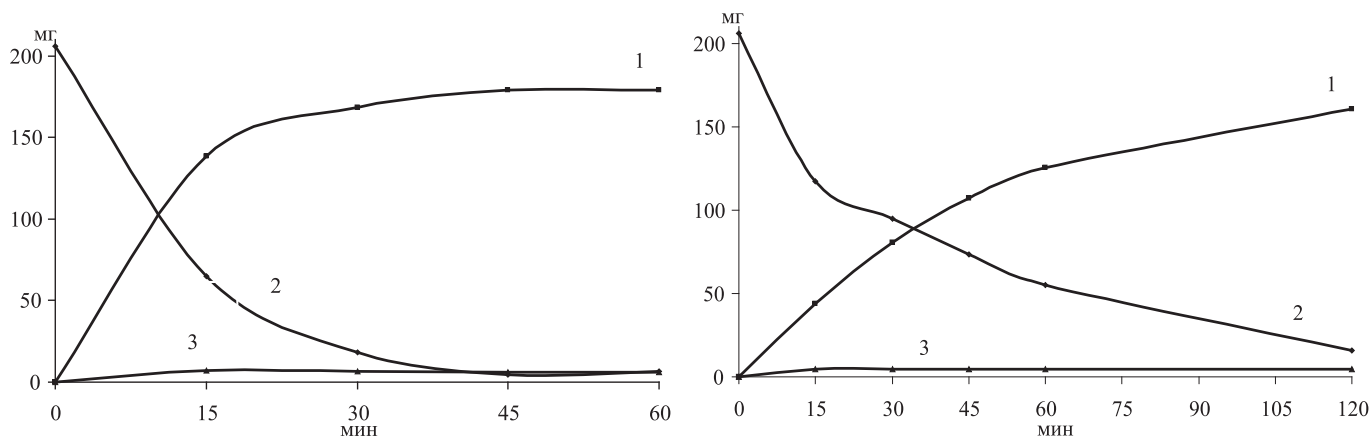


Рисунок. Динамика конверсии 200 мМ раствора 3-цианопиридина свободными (а) и иммобилизованными (б) клетками *R. ruber* gt1. Соединения: 1 – никотинамид, 2 – 3-цианопиридин, 3 – никотиновая кислота.

лоты в пробе составляет 84,05 и 4,38 мг. Полной конверсии 400 мМ субстрата ни свободными, ни иммобилизованными клетками за 120 мин не происходит.

Интересно отметить, что при концентрации субстрата более 200 мМ количество образующегося никотинамида в пробе не превышает 200-250 мг даже при увеличении времени реакции, после достижения данной концентрации в среде количество образующегося продукта с течением времени не нарастает. Это может быть связано с ингибированием фермента либо энергозависимых систем активного транспорта токсичным субстратом – органоцианидом. Также было обнаружено, что клетки могут накапливать и цианопиридин, и никотинамид, что, вероятно, приводит к отравлению нитрилгидратазы. По литературным данным, концентрация раствора 3-цианопиридина, трансформируемого нитрилгидратазой, в среднем составляла 10-50 мМ, а трансформацию очень высоких (свыше 200 мМ) концентраций этого субстрата не изучали [1, 2]. По нашим данным, для образования никотинамида клетками *R. ruber* gt1 концентрация 3-цианопиридина 200 мМ является оптимальной, т.к. в этом случае его конверсия наиболее эффективна. В этом случае нитрилгидратазная активность свободных клеток составляет 21, а иммобилизованных на носителе Урал ТМ-4 – 18 мкмоль/мг/мин. При трансформации ароматических нитрилов иммобилизованными клетками наблюдается небольшое снижение скорости реакции, тогда как для конверсии алифатических нитрилов (в частности, акрилонитрила) адсорбированные клетки того же штамма являются более эффективным биокатализатором, чем свободные [3].

Работа финансировалась программой поддержки междисциплинарных исследований УрО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cantarella L., Gallifuoco A., Malandra A., Martнnkovб L., Pasquarelli F., Spera A., Cantarella M.* Application of continuous stirred membrane reactor to 3-cyanopyridine bioconversion using the nitrile hydratase-amidase cascade system of *Microbacterium imperiale* CBS 498–74 // Enzyme Microb Technol. – 2010. – V. 47. – P. 64–70.

2. *Kaplan O., Nikolaou K., Riљvejcova A., Martнnkovб L.* Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi // Enzyme Microb Technol. – 2006. – V. 38. – P. 260–264.

3. *Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Кузнецова М.В., Олонцев В.Ф., Демаков В.А.* Иммобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – Т.43. – № 2. – С. 193–198.

Vasiliev D.M.[1], Maksimova Yu.G.[2], Demakov V.A.[1,2]

THE DYNAMICS OF 3-CYANOPYRIDINE TRANSFORMATION BY IMMOBILIZED AND FREE *RHODOCOCCUS RUBER* GT1 CELLS

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, vasilyevdim@mail.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, maks@iegm.ru

Summary. The dynamics of 3-cyanopyridine transformation to nicotinamide and nicotinic acid by adsorptively immobilized and free cells of *R. ruber* gt1 was studied. It is established that the concentration of 200 mM 3-cyanopyridine is optimal for the most effective formation of nicotinamide. The nitrile hydratase activity of free cells is 21, and immobilized on a carrier Ural TM-4 - 18 μmol/mg/min.

Key words: 3-cyanopyridine, nicotinamide, nicotinic acid, conversion, immobilized cells.

УДК 57.088.6

Darbinyan K.A.

CONTINUOUS BIOTRANSFORMATION OF ETHYLENE GLYCOL TO GLYOXAL BY APPLICATION OF FUNGAL ENZYMES

Microbial Depository Center (Division of SPC Armbiotechnology, National Academy of Sciences of Armenia), Abovyan, Republic of Armenia, microbio@sci.am

Summary. Based on the large scale screening of bacteria, streptomycetes, and fungi a novel thermophilic glycerol oxidase was revealed in the cultures of *Aspergillus* and *Botrytis*.

The strain *Aspergillus versicolor* MDC 12117 possessing high glycerol oxidase and catalase activities produced mycelial spheres in submerged cultivation has been studied in details.

Key words: biotransformation, ethylene glycol, glyoxal, *Aspergillus versicolor*, glycerol oxidase.

Introduction

Microbial enzymes, especially their immobilized forms are successfully used for biocatalysis and biotransformation of many substances being implemented in industrial scale productions [1,2].

Based on the large scale screening of over 250 strains of bacteria, streptomycetes, and fungi a novel thermophilic glycerol oxidase has been revealed in the cultures of genera *Aspergillus* and *Botrytis* [3].

Materials and methods

The strain *Aspergillus versicolor* MDC 12117 possessing high glycerol oxidase and catalase activities with production of mycelial spheres in submerged cultivation has been selected and studied in details. Glycerol oxidase was formed in the mycelia of the fungi grown on ethylene glycol as the sole carbon source.

Results and discussion

The enzyme was purified from the cell-free extract of *Aspergillus versicolor* MDC 12117 by a procedure, involving fractionation with ammonium sulfate, column chromatography and gel filtration on Sephadex G-200. The further purification resulted in the increase of enzyme activity approximately 240 times with 6.5 to 7.0% yield from biomass protein. The purified enzyme gave a single band on HPLC [4]. The molecular weight of this enzyme was 410 KD as determined by size-exclusion HPLC. The metal content of purified extremozymes was determined by ICP-MS Perkin Elmer Elan 9000 model ion-coupled plasma mass-spectrometer. Analytical grade copper ion solution was used as standard for metal determination. The enzyme contained 1.71g of copper/mol of enzyme protein. The optimum pH for enzyme was in limits of 6 to 7 with the optimum temperature 54°C. During the continuous process pH of the reaction suspension decreases slightly as the reaction proceeds, so it often useful to start the reaction near the high end of the maximum enzyme activity pH range, about 8.5-9.0, and allow it to drop during the reaction proceeds.

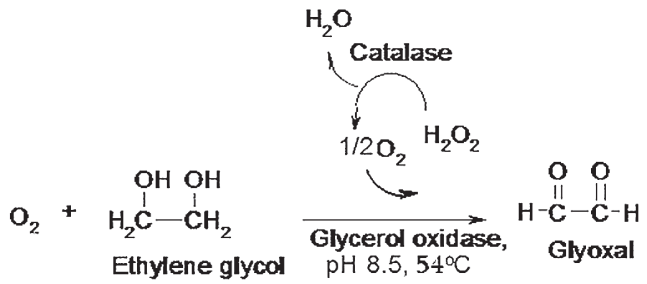


Figure. Enzymatic catalysis of ethylene glycol to glyoxal

The apparent Kms for ethylene glycol were 195 μmol and, maximum velocities for was 89,1μmol/min/mg of protein, respectively, the apparent Km and Vmax for ethylene glycol were 114mM and 2,68 μmol/min/mg of protein, respectively [5].

The percolation system with immobilized non-carrier cells of different groups of microorganisms without the carrier has been developed. The immobilized glycerol oxidase from *A. versicolor* has apparent Km and Vmax for ethylene glycol: 112mM and 2,47 μmol/min/mg of protein, respectively. The method can be acceptable for production of glyoxal in the continuous flow conditions.

The reactor using a fungal granules (mycelial spheres) might be more conductive to the yield of glyoxal. An examination of fungal spheres with high glycerol oxidase and catalase activity and their application for production of glyoxal are under the way.

This work was partially funded by the research grant from the Armenian National Science and Education Fund (ANSEF), New York, USA.

REFERENCES

1. *Bezborodov A.M., Zagustina N.A., Popov V.O.*. Enzymatic processes in biotechnology. –M.: Nauka, 2008. – 331 p.

2. Proc. of International Congress on Biocatalysis, "BIOCAT 2002 - 2010". Hamburg, Germany.

3. *Darbinyan K.A., Antonyan L.G., Hayrapetyan S.S.* Microbial transformation of ethylene glycol and acetic acid to glyoxylic acid // Proceedings of 3rd International Symposium on Problems of biochemistry, molecular, nuclear space biology and genetics, Dubna, Russia. – 2007. – P. 70.

4. *Darbinyan K.A.* Microbial catalysis of ethylene glycol to glyoxal // Proceedings of International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany. – 2010. – P. 91.

5. ***Isobe K.* Oxidation of ethylene glycol and glycolic acid by glycerol oxidase // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1995. – V. 59. – № 4. – P. 576-81.**

УДК 579.222.4

Долгих Н.П.[1,2], Фролкова К.С.[3], Максимов А.Ю.[1,2], Демаков В.А.[1,2]

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ИБУПРОФЕНАМИДА ШТАММОМ *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS*

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия; [2]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский государственный национальный исследовательский университет", г. Пермь, Россия, nadido@yandex.ru; [3]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Пермский национальный исследовательский политехнический университет", Пермь, Россия

Резюме. Исследована биотрансформация ибупрофенамида клетками штамма *Rhodococcus rhodochrous* 1185, обладающего стабильной высокой амидазной активностью. Установлено, что при биотрансформации 1,5 мМ ибупрофен амида в ибупрофен штаммом *R. rhodochrous* 1185 в течение 12 ч при 50°С выход продукта составляет 80,3%.

Ключевые слова: амидаза, биотрансформация, ибупрофен, *Rhodococcus*.

Введение

Бактерии, способные использовать в качестве источника углерода и азота ароматические нитрилы и амиды, распространены в различных типах почв. Некоторые такие соединения хоть и являются естественными метаболитами растений, но в то же время труднометаболизируемы [1, 2]. Поэтому микроорганизмы, способные к биотрансформации ароматических азотсодержащих соединений, могут быть использованы для биокаталитического синтеза ценных фармацевтических препаратов, таких как ибупрофен, напроксен и др.

Ибупрофен ((RS)-2-(4-изобутилфенил)-пропионовая кислота) является наиболее популярным и действенным нестероидным противовоспалительным средством (НПВС) на рынке лекарств. Известно, что биологической активностью обладает только S-изомер, тогда как R-ибупрофен неактивен [3, 4]. В отличие от химического синтеза биокаталитический метод может позволить производить активный S-энантиомер в один этап, без сложных процессов разделения, в мягких условиях, без примесей и с хорошим выходом. Субстратом для получения ибупрофена с помощью бактериальных ферментов могут служить нитрил или амид ибупрофена. Так биотрансформацию амида ибупрофена катализирует фермент амидаза [5]. Цель настоящей работы – изучение биотрансформации ибупрофен амида клетками ранее выделенного штамма *R. rhodochrous* 1185, обладающего стабильной высокой амидазной активностью.

Материалы и методы исследования

Культуру выращивали в 50 мл минеральной среды [6], содержащей в качестве источника углерода и азота пропионамид (10 мМ), в качестве дополнительного источника углерода – 0,1 % глюкозу в конических колбах общим объемом 250 мл. Для последующей биотрансформации клетки собирали центрифугированием при 4500 об/мин в течение 15 минут. Биомассу дважды промывали в калий-натриевом фосфатном буфере (pH=7,4).

Промытые клетки ресуспендировали в фосфатном буфере с добавлением ибупрофен амида до конечной концентрации 2 мМ. Общий объем пробы составлял 1 мл. Реакция проходила в течение 1 ч на закрытом шейкере при температуре 30°С при скорости вращения 88 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл концентрированной соляной кислоты. Дважды центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут.

Определение промежуточных продуктов метаболизма м**етодом хромато-масс-спектрометрии** проводили на аппарате 689/573T MSD (Agilent-Hewlett Packard). К надосадку добавляли 0,5 мл этилацетата и встряхивали в течение 30 мин. Органическую фазу переносили в новые микропробирки, хранили в холодильнике. Анализ проводили в следующих условиях: капиллярная колонка HP-5MS, температура колонки начальная – 60° С (3 мин), нагрев до 315° со скоростью 7°/мин. Температура испарителя 280°С, газ-носитель гелий.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было установлено, что штамм *R. rhodochrous* 1185 способен трансформировать ибупрофен амид в ибупрофен, но скорость трансформации не велика по сравнению с биотрансформацией водорастворимых алифатических амидов и ограничивается низкой растворимостью в воде как субстрата, так и продукта.

Ранее известные по литературе подобные биотрансформации проводились в течение 16 и более часов [4]. Известно, некоторые амидазы являются термостабильными ферментами. В частности, фермент из *R. rhodochrous* 1185 проявляет максимум активности при 50°С, что позволяет проводить биокатализ при нагреве среды. На основании этих данных была разработана новая методика проведения биотрансформации амида ибупрофена.

Промытые клетки ресуспендировали в фосфатном буфере с добавлением ибупрофен амида до конечных концентраций – 0,25; 1; 1,5 и 2 мМ. Общий объем пробы составлял 1 мл. Пробы отбирали через 1, 3, 6, 12 и 17 ч. Реакцию проводили параллельно при 30 и 50°С на закрытых шейкерах при скорости вращения 88 об/мин.

В результате проведенных реакций трансформации 1,5 мМ ибупрофен амида штаммом *R. rhodochrous* 1185 в течение 12 ч при 50°С, выход продукта составлял 80,3%. Таким образом, показано, что штамм *R. rhodochrous* 1185 эффективно трансформирует ибупрофенамид с образованием ибупрофена.

Работа поддержана АВЦП "Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2011 годы)" (проект 2.1.1/12133) и ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России, 2009-2013 гг.", (2009-1.1-201-018).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Карасевич Ю.Н.* Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. – М.: Наука, 1982. – 144 с.

2. *Хоменков В.Г., Шевелёв А.Б., Жуков В.Г., Загустина Н.А., Безбородов А.М., Попов В.О.* Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биодеградации ксенобиотиков у микроорганизмов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. № 8. – С. 133–152.

3. *Stock K.P., Geisslinger G., Loew D., Beck W.S., Bach G.L., Brune K.* 2 S-Ibuprofen versus Ibuprofen-raeemate Received // Rheumatol Int. – 1991. – V. 11. – P.199–202.

4. *Snell D., Colby J.* Enantioselective hydrolysis of racemic ibuprofen amide to S-(+)-ibuprofen by *Rhodococcus* AJ270 // Enzyme Microb. Technol. – 1999. – V. 24. – P. 160–163.

5. *Fournand D., Arnaud A.* Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity // J. Appl. Microbiol. – 2001. – V. 91. – P. 381–393.

6. *Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Козлов С.В., Максимова Ю.Г., Демаков В.А.* Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 // Прикл. биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. № 1. – С. 63–68.

Dolgikh N.P.[1,2], Frolkova K.S.[2,3], Maksimov A.Yu.[1,2]

BIOTRANSFORMATION OF IBUPROFEN AMIDE BY *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS*

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, nadido@yandex.ru; [2] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of UB RAS, Perm, Russia; [3]Perm National Research Technical University, Perm, Russia

Summary. *Rhodococcus rhodochrous* 1185 is described to possess high amidase activity. The whole-cell biotransformation of 1.5 mM ibuprofen amide into ibuprofen was carried out at 50 °C for 12 h, and product yield was 80.3 %.

Key words: amidase, biotransformation, ibuprofen, *Rhodococcus*.

УДК 604.2:663.531

Драгунова Ю.Е., Атыкян Н.А., Ревин В.В.

СОВМЕЩЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ГИДРОЛИЗА И БРОЖЕНИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева”, г. Саранск, Россия

Резюме: Показано, что наноструктурирование зернового сырья позволяет совмещать процессы ферментативного гидролиза и брожения в одну стадию при низких температурах. При этом в бражке накапливается до 7,0 % этилового спирта.

Ключевые слова: наноструктурированное зерновое сырье, дрожжи, бражка, спирт.

Введение

Интенсификация процессов производства спирта возможна за счет использования новых технологий и усовершенствования оборудования. Новые подходы предполагают введение энерго- и ресурсосберегающих технологий, введение мутантных рас дрожжей, микробных ферментных препаратов и др.[1].

Разработка методов совместного проведения ферментативного гидролиза и брожения позволит ускорить и удешевить процесс производства спирта за счет сокращения стадий разваривания, охлаждения, осахаривания сусла [2]. Целью нашей работы являлось изучение возможности сопряжения процессов ферментативного гидролиза и брожения при получении биоэтанола из наноструктурированного зернового сырья [3].

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили: разные по размерам фракции зерна (Вариант 1 – зерно заводского измельчения; Вариант 2 – наноструктурированное зерновое сырье), ферментные препараты – Альфазим 2500L и Диазим Х-5, Ламинекс БГ, дрожжи ***Saccharomyces cerevisiae*** раса Ангел, сусло, бражка и полученный из них спирт-сырец. Дозы внесения ферментных препаратов были постоянны (1,2 Е/г крахмала Альфазим 2500L + 5,8 Е/г крахмала Диазим Х-5 + 0,04 Е/г сырья Ламинекс БГ).

Результаты исследования и обсуждение

В процессе работы нами был определен средний размер частиц наноструктурированного зерна, который составляет порядка 250 нм (определено с помощью лазерной интерференционной микроскопии на приборе ЛИМ (Москва, Россия)). Такой размер частиц, как мы предполагаем, может быть уже достаточным для гидролиза полисахаридов сырья в мягких условиях (без предварительного разваривания или кислотного воздействия). Это подтверждается и при анализе водорастворимых углеводов (осуществлялся методом ВЭЖХ на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония)). Было показано, что накопление глюкозы, сахарозы и мальтозы в большей степени наблюдается в сусле, приготовленном из наноструктурированного зерна, о чем свидетельствуют количественные показатели содержания моносахаридов в сбраживаемом сусле, представленные в Табл. 1.

Таблица 1.

Влияние степени измельчения зерна на концентрацию сахаров в сусле.

Измельчение	$C_{глюкозы}$, мг/мл	$C_{сахарозы}$, мг/мл	$C_{мальтозы}$, мг/мл
Стандартное	45,2	4,67	16,4
Наноструктурированное зерно	72,1	3,2	29,5

Сопряжение процессов гидролиза и брожения осуществляли в анаэробных условиях стационарно в лабораторном биореакторе серии A plus (Sartorius, Германия) в течение 72 ч. В сусло вносили засевные дрожжи в количестве 0,1%. Сбраживание вели при температуре 30°С.

После завершения процесса брожения в бражке определяли количество несброженных углеводов, суммарное количество сбраживаемых углеводов, количество декстринов и количество спирта. Для этого получали дистиллят путем отгонки паров спирта с водяным паром и в дистилляте определяли содержание спирта пикнометрическим методом.

Данные об изменении компонентного состава бражки в зависимости от степени измельчения сырья представлены в Табл. 2.

Таблица 2.

Изменение компонентного состава бражки в зависимости от степени измельчения сырья.

Бражка	Количество несброженных углеводов, г/100см^3	Суммарное содержание сбраживаемых углеводов, г/100см^3	Содержание декстринов, г/100см^3	pH	Содержание спирта, % (объемные)
Вариант 1	0,350±0,008	0,260±0,010	0,180±0,01	3,73±0,16	1,14±0,05
Вариант 2	0,120±0,009	0,015±0,020	0,100±0,020	4,06±0,14	7,00±0,10

Как видно из Табл. 2 различная степень измельчения зерна влияет не только на степень осахаривания, но и на содержание спирта в бражке, а также на его выход. Так, при недостаточном измельчении в сусле варианта 1 мы наблюдали меньший выход спирта, по сравнению с вариантами 2. Это может быть обусловлено следующими причинами: размер крахмальных гранул в зерне составляет около 2 мкм, а мы получили частицы размером около 0,25 мкм (8-10 раз меньше) т.е. осколки крахмальных гранул. Гидролиз таких мелких осколков в водной среде может вестись без предварительного разваривания крахмала. При этом накапливается достаточно сахаров для ведения процесса и высвобождение сахаров идет в течение всего процесса брожения, что позволяет полнее использовать углеводы сырья и совместить два процесса – осахаривание и брожение. В результате имеет место экономия энергии и времени, затрачиваемых на предварительную подготовку сырья к сбраживанию.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что сопряжение процессов ферментативного гидролиза и брожения наноструктурированного зернового сырья является одним из перспективных направлений в производстве спирта. Этот метод позволит значительно ускорить и удешевить процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Олийничук А.С., Левандовский Л.В., Ткаченко А.Ф. Технология сбраживания зернового сусла путем прямой ферментации негидролизованного крахмала // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2008. –№1. – С. 30-31.

2. Karimi K., Emtiazi G., Taherzadeh M.J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with Mucor inducus, Rhizopus oryzae, and Saccharomyces cerevisiae. II Enzyme Microb. Tech, 2006. –V. 40. – P. 138-144.

3. Патент РФ 2407798, МПК C12P7/06. Способ получения спирта / Ревин В.В., Атыкян Н.А. (Россия). Опубл. 27.12.2010, Бюл. №36, 3 с.

Dragunova Ju.E., *Atykyan* N.A., *Revin V.V.*

COMBINED PROCESSES OF HYDROLYSIS AND FERMENTATION OF NANOSTRUCTURED GRAIN RAW MATERIAL

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Mordovia NP Ogarev State University», Mordovia, Saransk, Russia, 430005, Bolshevistskaya st, 68, dragunovaJulya@yandex.ru

Summary. It was shown that nanostructuring of grain raw material allowed combining the processes of enzymatic hydrolysis and fermentation in one stage under low temperatures. It was found that up to 7.0% ethanol was accumulated in the wort.

Keywords: nanostructured raw materials, yeast, wort, alcohol.

УДК 544.473:577.15 – 57.088.6 – 547.27

Елькин А.А.[1], *Кылосова Т.И.*[2], *Гришко В.В.*[3], *Ившина И.Б.*[1,2]

ПОЛУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУЛЬФОКСИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* ИЭГМ 66

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, an220@mail.ru; [2]Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия, ivshina@iegm.ru; [3]Учреждение Российской академии наук Институт технической химии Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, grishko@aport.ru

Резюме. На основе иммобилизованных в гелевом носителе клеток родококков разработан эффективный биокатализатор, проявляющий высокую сульфидокисляющую активность в отношении арилалкилсульфидов, характеризующийся функциональной стабильностью в течение 12 мес хранения и возможностью повторного эффективного использования на протяжении 4 циклов биотрансформации сульфидного субстрата. Полученные экспериментальные данные представляют интерес для разработки биотехнологических способов получения практически значимых соединений – сульфоксидсодержащих интермедиатов тонкого органического синтеза и оптически чистых изомеров лекарственных препаратов.

Ключевые слова: родококки, иммобилизация, оптически активные сульфоксиды.

Введение

В химической промышленности оптически активные органические сульфоксиды используются в качестве интермедиатов в тонком органическом синтезе. Антибактериальные, противовоспалительные и противоязвенные препараты на основе сульфоксидсодержащих соединений находят широкое применение в медицинской практике [1]. Получение сульфоксидов из прохиральных сульфидов осуществляется в основном методами химического синтеза. Альтернативой многостадийному химическому синтезу получения оптически активных соединений являются биологические технологии на основе целых микробных клеток. Особый интерес среди микроорганизмов, катализирующих образование оптически активных сульфоксидов, представляют актинобактерии рода ***Rhodococcus***. Цель настоящего исследования – разработка стабильного бактериального биокатализатора для получения оптически активных сульфоксидов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм ***R. rhodochrous*** ИЭГМ 66 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, www.iegm.ru/iegmcol). Биотрансформацию тиоанизола осуществляли в глицеринсодержащей среде или минеральной среде “К” с добавлением ***н***-гексадекана в качестве источника углерода [2]. Тиоанизол вносили в виде раствора в изопропаноле. Продукты биотрансформации экстрагировали с помощью этилацетата, качественный состав их контролировали методом ТСХ на пластинах с флуоресцентной добавкой, выявляя их в УФ. Содержание продуктов биотрансформации определяли методом хромато-масс-спектрометрии. Оптическую чистоту образцов, очищенных с помощью метода колоночной хроматографии на силикагеле, определяли методом поляриметрии. Иммобилизацию родококков проводили путем внесения клеточной суспензии в раствор поливинилового спирта (ПВС) согласно методике, описанной в работе [3]. Полученный биокатализатор регидратировали в 0,5% р-ре NaCl в течение 24 ч и добавляли из расчета 200 гранул (5,0±0,6x10^6 кл/мл) на 100 мл среды.

Результаты и обсуждение

Как было показано ранее, свободные клетки родококов в присутствии *н*-гексадекана способны трансформировать тиоанизол (0,5 г/л) в соответствующий сульфоксид в течение 6 сут культивирования. Использование более высоких концентраций сульфида приводило к подавлению сульфидокисляющей активности родококков. Иммобилизация бактериальных клеток в криогель ПВС повышала окислительную активность родококков, что способствовало сокращению продолжительности процесса биотрансформации 0,5 г/л тиоанизола до 24 ч и использованию более высоких (до 1,5 г/л) концентраций сульфидного субстрата [2]. Полная биоконверсия тиоанизола (1,5 г/л) в сульфоксид наблюдалась в течение 3 сут инкубации родококков. При этом образование продукта более глубокого окисления тиоанизола – сульфона не регистрировалось.

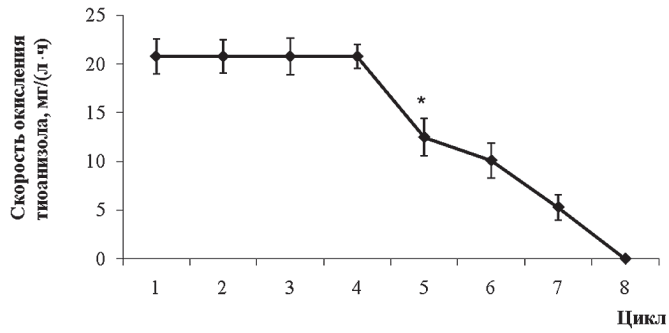


Рисунок. Сульфидокисляющая активность иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 при многократном использовании для биотрансформации тиоанизола.
Данные о скорости окисления тиоанизола в 5-м цикле достоверно ($p<0,05$) отличаются от первых 4-х циклов.

При исследовании возможности повторного использования биокатализатора установлено, что трансформация тиоанизола наиболее эффективно протекала в течение первых 4-х циклов. При последующей его эксплуатации наблюдалось резкое снижение целевой активности (рисунок).

Полученный биокатализатор сохранял сульфидокисляющую активность в отношении тиоанизола в течение 12 мес хранения. Более длительные (24 мес) сроки хранения биокатализатора приводили к увеличению продолжительности процесса трансформации тиоанизола в соответствующий сульфоксид и образованию (свыше 10%) побочного сульфона. Хранение биокатализатора не оказывало влияния на оптическую чистоту синтезируемого сульфоксида (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние продолжительности хранения на биокаталитическую активность иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66.

Продолжительность хранения, мес	Время достижения полной конверсии тиоанизола*, сут	(S)-Сульфоксид, %	Сульфон, %	p, %
–	3	100,0	–	82,1
12	3	100,0	–	81,9
24	4	89,1	10,9	82,6

Примечание. Используемая в эксперименте концентрация тиоанизола составляла 1,5 г/л; *p* - оптическая чистота.

По нашим данным, полученный биокатализатор на основе иммобилизованных родококков обеспечивал направленное окисление не только тиоанизола, но и его гомологов в оптически активные сульфоксиды с (*S*)-конфигурацией асимметрического центра (табл. 2).

Таблица 2.

Сульфидокисляющая активность клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в отношении гомологов тиоанизола.

Сульфид	Сульфоксид, %	p, %	Конфигурация сульфоксида	Сульфон, %
Фенилэтилсульфид	73,0	54,7	S	17,0
п-Толилметилсульфид	68,0	48,3	S	9,0
Бензилметилсульфид	75,0	84,6	S	21,0

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что иммобилизованные в гелевом носителе клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 обеспечивают эффективную конверсию тиоанизола и его гомологов (фенилэтил-, *п*-толилметил- и бензилметилсульфидов) в соответствующие (*S*)-сульфоксиды. Разработанный биокатализатор характеризуется функциональной стабильностью в течение 12 мес хранения и возможностью его повторного использования на протяжении 4 циклов биотрансформации исследованных сульфидов.

Работа поддержана грантами Президента РФ "Ведущие научные школы" НШ-64403.2010.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Биологическое разнообразие" (номер гос. регистрации 01200963679) и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (государственный контракт № 16.518.11.7069).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Толстиков А.Г., Гришко В.В., Ившина И.Б.* Энантиоселективное биокаталитическое окисление органических сульфидов в хиральные сульфоксиды // Современные проблемы асимметрического синтеза; УрО РАН. Екатеринбург. – 2003. – С. 165–205.

2. *Елькин А.А., Гришко В.В., Ившина И.Б.* Окислительная биотрансформация тиоанизола свободными и иммобилизованными клетками *Rhodococcus rhodocrhous* ИЭГМ 66 // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. № 6. – С. 637–643.

3. *Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gavrin A.Yu., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Jeffree C.E.*, Philp J.C. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alchohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // J. Microbiol. Methods. – 2006. – V. 65. – P. 596–603.

Elkin A.A.[1], Kylosova T.I.[2], Grishko V.V.[3], Ivshina I.B.[1,2]

PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE SULFOXIDES USING A BIOCATALYST BASED ON IMMOBILIZED *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* IEGM 66 CELLS

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, an220@mail.ru; [2]Perm State National Research University, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru; [3]Institute of Technical Chemistry, UB RAS, Perm, Russia, grishko@aport.ru

Summary. Based on rodococcal cells immobilized gel, an efficient biocatalyst was produced that exhibited high sulfide-oxidizing activity towards aryl alkyl sulfides, and was characterized by a functional stability over 12 month storage and a possible efficient reuse during four cycles in sulfide biotransformation. The obtained data are of interest as to the development of biotechnological methods for production of industrially valuable compounds, notably sulfoxide-containing intermediates in fine organic synthesis and optically pure isomers of drugs.

Key words: rhodococci, immobilization, optically active sulfoxides.

УДК 604.2:661.722:663.531

Захаркин Д.О., Атыкян Н.А., Ревин В.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СТЕПЕНИ ДИСПЕРСНОСТИ ПОМОЛА ПШЕНИЧНОГО ЗЕРНА НА НАКОПЛЕНИЕ САХАРОВ В СУСЛЕ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва", г. Саранск, Россия, dio.zaharkin@yandex.ru

Резюме. Проанализирована динамика накопления водорастворимых углеводов в сусле в зависимости от степени помола зерна при водно-ферментативной обработке зернового замеса в мягких условиях.

Ключевые слова: дисперсные частицы, помол, крахмал, сусло, моносахариды

Введение

Рост спроса на спиртосодержащую продукцию пищевого и технического назначения, а также экономические условия жесткой конкуренции среди производителей вынуждают отказаться от классических энерго- и ресурсозатраных технологий. Ряд авторов [1,2] отмечают, что наибольший интерес в настоящее время представляет технология производства этилового спирта при мягких условиях водно-ферментативной обработки, в частности - из ультрадиспергированного сырья.

Разрабатываемая нами технология направлена на сбраживание сусла из ультраизмельченного пшеничного зерна, не подвергавшегося процессу разваривания. Для диспергирования зерна применялась планетарная шаровая мельница Retsch PM100 (Германия), которая позволяет при одностадийном помоле в течение 30 мин получить измельченную фракцию с размером частиц менее 1 мкм.

Материалы и методы исследования

Анализируемым объектом в нашем исследовании выступает зерновой замес с гидромодулем 1:3. Использовалось зерно пшеницы со средним содержанием влаги 11,3±0,3% и 57,5±0,5% условного крахмала. Водно-ферментативная обработка проводилась при температуре 60°С комплексом мультиэнзимных препаратов Мезомэй-2500 (Beijin Shifa Multi-Business Agency, КНР), Глюкомэй-8000 (Beijin Shifa Multi-Business Agency, КНР) и Ламинекс БГ2 (Genencor International Oy, Финляндия). Углеводный состав гидролизатов изучался методом ВЭЖХ на LC20 Prominence (Shimadzu, Япония) с использованием колонок SupelcoGel PB.

Результаты и обсуждение

Согласно проводимым ранее исследованиям [3, 4], наибольший выход продуктов разрушения крахмала наблюдается при уменьшении размеров осахариваемого материала. В проведенном исследовании, мы проводили измельчение образцов зерна до ультрадисперсных размеров за промежутки от 10 до 30 мин обработки. Помол свыше 30 мин неэффективен по причине агрегации частиц и потери части питательных веществ в ходе реакции Майара.

Зависимость между концентрацией водорастворимых сахаров и степенью помола наблюдается уже на этапе получасовой выдержки водно-зернового замеса в термостатируемых условиях. Как видно из данных, представленных в таблице , при увеличении продолжительности помола происходит не только незначительное увеличение экстракции некрахмалистых сахаров (сахароза, арабиноза, галактоза), но и увеличение концентрации глюкозы, мальтозы и более крупных углеводов, легкоутилизируемых дрожжами *S.cerevisiae*.

По мере обработки мультиэнзимными комплексами в первую очередь происходит разрушение растворимых декстринов и короткоцепочечных крахмалистых сахаров до мальтозы и глюкозы. При совместном внесении комплекса ферментов скорость процесса накопления глюкозы в спиртовом сусле в первую очередь зависит от концентрации высвобожденной мальтозы. В течение первых 10 мин в пробах концентрация детектируемой мальтотриозы и мальтотетрозы снижается до значений, менее 1 мг/мл и стабилизируется на этот уровне. Концентрация некрахмалистых сахаров стабилизируется по мере продолжения процесса осахаривания, быстрее выходя на максимальное значение по мере уменьшения размера ча-

Таблица 1.

Влияние степени измельчения пшеничного зерна на накопление водорастворимых углеводов в водно-зерновом замесе при 60°С при 30 мин. экстракции

Продолжительность фактического помола на варио-планетарной шаровой мельнице Retsch PM100 при режиме 400 об/мин	Мальтотриоза, мг/мл	Мальтотетроза, мг/мл	Сахароза, мг/мл	Мальтоза, мг/мл	Глюкоза, мг/мл	Фруктоза, мг/мл
10 мин	3,22±0,11	2,94±0,08	5,61±0,19	15,43±0,73	5,41±0,14	2,25±0,09
20 мин	3,41±0,17	3,02±0,10	5,69±0,17	16,12±0,77	5,48±0,21	2,31±0,11
30 мин	4,53±0,24	3,55±0,16	5,84±0,21	19,51±0,92	7,12±0,39	2,37±0,12

стиц. Пиковая концентрация мальтозы (38,17 мг/мл для 30ти минутного помола выявлена на 20 мин обработки. После 20 мин обработки скорость накопления глюкозы во всех 3х пробах падает по мере распада высвобожденной мальтозы. К 30 мин процесса осахаривания максимальная концентрация глюкозы выявлена в пробе с 30 мин помолом и составляет 64,72 мг/мл при остаточной концентрации мальтозы 19,75 мг/мл.

Заключение

Таким образом, при проведении исследования выявлено, что увеличение степени помола зернового сырья позволяет проводить гидролиз крахмала в более мягких условиях. При этом в процессе водно-ферментативной обработки в достаточных количествах накапливаются низкомолекулярные сахара – основа для последующего сбраживания. Кроме того, такой подход позволяет ускорить и удешевить процесс приготовления сусла за счет сокращения времени и затрат энергии на предварительную обработку сырья, а также снизить образование ингибиторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яровенко В.Л. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов. – М.: Колос-Пресс, 2002. – 465 с.

2. Roehr M. The biotechnology of ethanol: classical and future applications. – Berlin: Wiley-VCH, 2001. – 232 p.

3. Патент РФ 2407798, МПК C12P7/06. Способ получения спирта / Ревин В.В., Атыкян Н.А. (Россия). Опубл. 27.12.2010, Бюл. №36, 3 с.

4. Барнашова Г.С., Ревин В.В., Карпова Т.В. Углеводный состав зерна пшеницы в зависимости от помола при производстве спирта // Биотехнология начала III тысячелетия: Сборник тезисов Международной научной конференции, 2010. – С. 46-47.

Zaharkin D.O., Atykjan N.A., Revin V.V.

THE INFLUENCE OF DISPERSITY OF WHEAT GRAIN GRINDING ON CARBOHYDRATE ACCUMULATION IN MASH

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “N.P. Ogarev Mordovia State University” Mordovia Republic, Saransk, Russia, dio.zaharkin@yandex.ru

Summary: Dynamics of soluble carbohydrate accumulation in wheat mash depending on the degree of grain grinding during water-enzymatic treatment of grain mash under mild conditions is analyzed.

Keywords: dispersed particles, milling, starch, mash, monosaccharides.

УДК 579.222.4

Лебедева Е.С.[1,2], Ивашина Т.В.[1], Донова М.В.[1]

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ ПЕРВУЮ СТАДИЮ ОКИСЛЕНИЯ СТЕРИНОВ У ШТАММА *MYCOBACTERIUM* SP. ВКМ АС-1815Д

[1]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия; [2]Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино, Россия, EkaterinaLebedeva2612@mail.ru

Резюме. Штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1815Д эффективно окисляет стерины до андростендиона (АД). С целью выяснения первых этапов катаболизма стеринов клонированы и секвенированы гены *choD* и *hsd*, кодирующие холестерин оксидазу и 3β(17)-гидроксистероид дегидрогеназу. Продукт гена *choD* (63,5 кДа) гомологичен белкам InterPro-семейства IPR006076. При экспрессии гена *choD* в *E. coli* синтезировался функционально активный белок, ассоциированный с мембранной фракцией клеток. Фермент проявлял активность в отношении холестерина, β-ситостерина, дегидроэпиандростерона (ДГЭА) и прегненолона. Продукт гена *hsd* (40,15 кДа) отнесен к SDR суперсемейству белков. Выявлен высокий уровень гомология Hsd (78-80% идентичности) с гидроксистероид дегидрогеназами Rv1106c *M. tuberculosis* H37Rv и MSEG_5228 *M. smegmatis* mc2 155. Рекомбинантный белок, полученный в результате экспрессии *hsd* в клетках *Escherichia coli*, эффективно трансформировал холестерин в холестенон и ДГЭА в АД, что подтвердило его способность к модификации 3β-OH-5-ен в 3-кето-4-ен структуру Δ5-3β-ол-стероидов. Для выяснения участия ChoD и Hsd в катаболизме стеринов получены штаммы АС-1815Д с инактивированными генами *choD* и *hsd*. ChoD-мутант сохранил способность к окислению ситостерина с образованием 3-кето-4-ен стероидов. Образование 3-кето-4-ен стероидов из 3-бета-ол-5-ен субстратов *hsd*-мутантом было несколько снижено. Полученные результаты свидетельствуют об участии в окислении 3-гидроксильной группы и Δ5-Δ4-изомеризации стеринов у АС-1815D нескольких ферментов.

Ключевые слова: *Mycobacterium*, стероиды, холестериноксидаза, 3β(17)-гидроксистероид дегидрогеназа.

Быстрорастущий непатогенный штамм *Mycobacterium* sp. Ас-1815Д способен к эффективной биоконверсии стеринов с образованием андростендиона (АД) и андростадиендиона (АДД) [1]. Начальным этапом окисления стеринов является структурная перестройка стероидного ядра, при которой 3β-ол-5-ен группировка стерина преобразуется в 3-кето-4-ен-структуру. Ключевыми ферментами, катализирующими данную реакцию, являются холестерин оксидазы (ХО) и 3β-гидроксистероид дегидрогеназы/изомеразы (ГСД). Цель настоящей работы – клонирование, секвенирование и изучение функциональной роли генов *Mycobacterium* sp. Ас-1815Д, кодирующих ХО и 3β-ГСД.

Для идентификации гена ХО в составе генома Ас-1815Д использовали меченый ^{32}P участок гена Rv3409c *M. tuberculosis* H37Rv. В результате было подтверждено наличие в геноме Ас-1815D гомологичного гена, локализованного в пределах EcoRI-фрагмента длиной 3,4 т.п.н. EcoRI-фрагмент клонировали в векторе pBluescript II KS$^+$ и секвенировали. В секвенированной последовательности обнаружена ОРС (обозначена как *choD*), кодирующая белок с молекулярной массой 63,5 кДа. Наибольшая гомология ChoD (78-89% идентичности) выявлена с ХО из *M. tuberculosis, M. bovis* и *M. smegmatis* mc^{2}155. Все указанные белки относятся к InterPro-семейству IPR006076. В аминокислотной последовательности белка ChoD обнаружено наличие двух трансмембранных доменов (положения 7-25 и 70-89). В N-концевом участке белка (положение 11-27) выявлен консервативный ФАД-связывающий мотив G-X-G-$(X)_2$-G-(X_3)-A-(X_6)-G. Для подтверждения функции ChoD сконструирован штамм с повышенным синтезом белка. Для этого ОРС *choD* амплифицировали с использованием специфических праймеров и клонировали в векторе pET22b. Сконструированную плазмиду pET-*choD*, кодирующую ХО с дополнительными а.о. на С-конце (LEHHHHHH), использовали для экспрессии *choD* в клетках *E. coli* BL21(DE3). Экспрессия гена в *E. coli* привела к синтезу функционально активной ХО (64,6 кДа), ассоциированной с мембраной. Наряду с холестерином, фермент окислял ситостерин, ДГЭА, эргостерин и прегненолон.

Сравнение аминокислотной последовательности, выведенной из нуклеотидной последовательности гена *hsd* позволило отнести его к суперсемейству белков SDR. Наибольшая гомология белка (78-80% идентичности) выявлена с ГСД *M. tuberculosis* H37Rv, *M. vanbaalenii*, *M. smegmatis* mc2 155 и *M. gilvum* PYR-GCK. Следует отметить, что среди выявленных гомологов биохимически охарактеризованы только два белка - Rv1106c *M. tuberculosis* H37Rv и MSEG_5228 *M. smegmatis* mc2 155 [2, 3]. В N-концевом участке ГСД выявлен консервативный мотив G-X-G-$(X)_2$-G-$(X)_{10}$-G, характерный для ферментов, катализирующих НАДФ(Н) и НАД(Н)–зависимые реакции и участвующий в связывании кофакторов. При экспрессии гена *hsd* в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) наблюдался синтез белка с теоретически рассчитанной молекулярной массой (40,15 кДа) и обладающий как 3β- так и 17β-гидроксистероид дегидрогеназной активностью.

Для выяснения участия продуктов идентифицированных генов в первых этапах трансформации стероидов получены штаммы Ac-1815Д с инактивированными генами *choD* и *hsd*. Показано, что введение мутаций как в *choD*-ген, так и в ген *hsd* не приводит к блокированию окисления 3-гидроксигруппы и изомеризации 5-ен-связи в кольце А стеринов, что свидетельствует об участии в этом процессе нескольких ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Донова М.В.* Трансформация стероидных соединений актинобактериями // Прикл. биохим. микробиол. – 2007. – Т. 43(1). – С. 5–18.

2. *Yang X.*, *Dubnau E.*, *Smith I.*, *Sampson N.S.* Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3β-hydroxysteroid dehydrogenase // Biochemistry. – 2007. – V. 46(31). – P. 9058–9067.

3. *Uhía I.*, *Galán B.*, *Morales V.*, *García J.L.* Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 // eEnviron. Microbiol. – 2011. – V. 13. N. 4. – P. 943–959.mi_

Lebedeva E.S.[1,2], Ivashina T.V[1], Donova M.V[1]

IDENTIFICATION OF GENES KATALIZING INITIAL STEP IN STEROL OXIDATION BY *MYCOBACTERIUM* SP. AC-1815D

[1]Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia; [2]Puschino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russia, EkaterinaLebedeva2612@mail.ru

Summary. *Mycobacterium* sp. Ac-1815D strain is capable of effective oxidizing of sterols to androstenedione (AD). To elucidate the initial steps in sterol catabolism, two genes, - *choD* and *hsd*, encoding cholesterol oxidase and 3β(17)-hydroxysteroid dehydrogenase were cloned and sequenced. The deduced *choD* gene product (M_r 63.5 kDa) showed homologies to a large number of proteins belonging to the InterPro-family EPR006076, which includes various FAD-dependent oxidoreductases. The expression of *choD* in *E. coli* resulted in the synthesis of functional cholesterol oxidase that associated with membrane fraction. The enzyme showed activity towards cholesterol, β-sitosterol, dehydroepiandrosterone (DHEA), pregnenolone. The *hsd* gene product (M_r 40.15 kDa) was referred to the SDR superfamily of proteins. The Hsd was shown to be homologous (78-80% identity) to Rv1106c *M. tuberculosis* H37Rv and MSEG_5228 *M. smegmatis* mc2 155. The recombinant Hsd protein expressed in *E. coli* was capable of effective converting of cholesterol to cholestenone and DHEA to AD, thus confirming its ability to modify 3β-hydroxy-5-ene- to 3-keto-4-ene moiety of Δ5-3 β-ol-steroids. To clarify whether the ChoD and Hsd play a crucial role in sterol catabolism, knockout of each gene in Ac-1815D was obtained. The *choD* mutant oxidized sitosterol forming exclusively 3-keto-4-ene steroids. The production of 3-keto-4-ene steroids from 3-beta-ol-5-ene substrates by *hsd* mutant was slightly affected. The results obtained indicated that few enzymes can catalyze the oxidation of 3-hydroxy group and Δ5 to Δ4-isomerisation in Ac-1815D.

Key words: *Mycobacterium*, steroids, cholesterol oxidase, 3β(17)-hydroxysteroid dehydrogenase

---

УДК 579.20

Мараков Е.А., Кононова Л.И., Коробов В.П.

ПОЛУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОГО К ВАНКОМИЦИНУ ШТАММА *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* 33 И ЕГО ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, kononova_l@iegm.ru

Резюме. Представлен метод получения лабораторного штамма *Staphylococcus epidermidis* 33 Van^r с высоким уровнем устойчивости к ванкомицину и описаны его свойства – значительное увеличение размеров клеток, слабое накопление биомассы и снижение скорости роста на жидкой питательной среде, а также снижение чувствительности к катионным препаратам – лизоциму и низкомолекулярному пептиду варнерину.

Ключевые слова: стафилококки, ванкомицин, резистентность, лизоцим, варнерин.

Введение

Появление устойчивости стафилококков к гликопептидному антибиотику ванкомицину требует тщательного изучения физиологических свойств бактерий, позволяющих им адаптироваться и выживать при повышенных концентрациях этого антибиотика. Так, биохимическим и ультраструктурным анализом резистентных к ванкомицину стафилококков показано утолщение клеточных стенок бактерий, разрыхление их поверхностных структур и формирование новых мишеней действия, локализованных вдали от главных мишеней антибиотика на плазматической мембране [1]. Характерной особенностью Van^r-стафилококков является также наличие устойчивости и к другим антибиотикам, а также снижение чувствительности к лизирующему клеточные стенки стафилококков ферментативному препарату лизостафину. Для коагулазонегативных стафилококков, как и для вида *Staphylococcus aureus*, устойчивость к ванкомицину имеет гетерогенный характер [2]. Целью настоящей работы было изучение физиологических особенностей бактерий штамма *S. epidermidis* 33 при формировании его Van^r-варианта.

Материалы и методы исследования

В работе использован штамм *S. epidermidis* 33, полученный из коллекции ГНИИСКМБП им. Тарасевича. Бактерии культивировали на жидкой питательной среде LB [3] с повышающимися концентрациями ванкомицина, начиная с близкой к минимальной подавляющей концентрации, с закреплением признака на плотной питательной среде LB, содержащей те же концентрации антибиотика.

Антибактериальную активность и МПК для ванкомицина, лизостафина и лизоцима изучаемых штаммов определяли методом двукратных серийных разведений в 96-луночных иммунологических планшетах. В лунки, содержащие питательную среду LB, вносили бактерии лог-фазы роста до конечной концентрации 10^5 КОЕ/мл. Определение чувствительности бактерий к низкомолекулярному катионному пептиду варнерину проводили, как представлено ранее [4]. Чувствительность к антибиотикам выявляли диско-диффузионным методом [5].

Результаты и обсуждение:

Обнаружено, что полученный в лаборатории под прессом возрастающих концентраций антибиотика резистентный штамм *S. epidermidis* 33 Van^r обладал высоким уровнем устойчивости к ванкомицину (МПК ≥400 мкг/мл), превышая МПК ванкомицина исходного штамма более чем на 2 порядка. Устойчивость Van^r-штамма к низкомолекулярному катионному пептиду варнерину возрастала более чем в 500 раз. Вместе с тем, резистентный штамм сохранял чувствительность к лизостафину – комплексу лизирующих пептидогликан гидролаз, но становился менее чувствительным к лизоциму (табл. 1). Появление Van^r-фенотипа также сопровождалось возникновением устойчивости к антибиотикам оксациллину, который, как и все бета-лактамные антибиотики, подавляет синтез пептидогликана, ингибируя ферменты транс- и карбоксипептидазы, и фузидину, мишенью которого являются факторы элонгации, необходимые для синтеза белка.

Сравнение динамики роста исследуемых штаммов показало снижение скорости роста резистентного штамма и значительное отста-

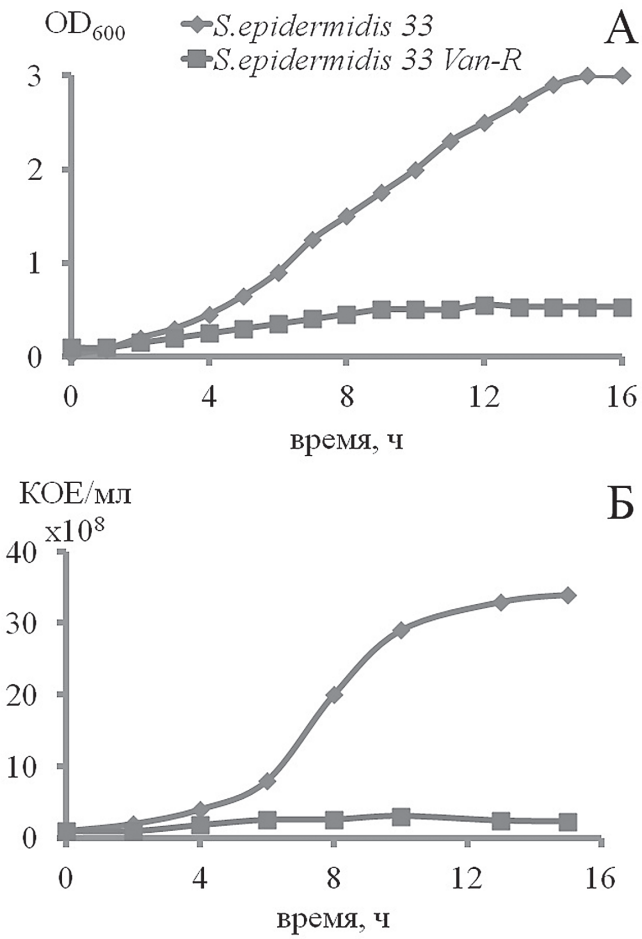


Рис. 1. Сравнение оптической плотности и КОЕ бактериальных культур *S. epidermidis* 33 и *S. epidermidis* 33 Van^r при росте на среде LB. А – оптическая плотность при 600 нм, Б – численность бактерий, КОЕ/мл.

вание в накоплении биомассы (рис.1). Время генерации родительского штамма составляло 73 мин, в то время, как время генерации Van^r-штамма – 88 мин. Микроскопическое исследование бактериальных клеток показало, что размеры клеток Van^r-штамма превосходят размеры клеток родительского штамма в 1,5-2 раза.

Заключение

Таким образом, развитие устойчивости к ванкомицину сопровождается различными изменениями физиологических и морфологических характеристик штамма *S. epidermidis* 33, а также чувствительности к катионным пептидным соединениям.

Таблица 1.

Характеристика штаммов *S. epidermidis* 33 и *S. epidermidis* 33 Van^r

Штаммы	Время генерации, мин	МПК ванкомицина, мкг/мл	МПК варнерина, мкг/мл	МПК лизостафина, мкг/мл	МПК лизоцима, мкг/мл
S. epidermidis 33	73	≤4	0,25	1	≤0,5
S. epidermidis 33 Vanr	88	≥400	≥125	1	≥2

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 10-04-96086-р_урал_а, 11-04-96025-р_урал_а, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (проект № 09-П-4-1019) и УрО РАН (№№ 09-М-14-2002, 10-14-12-НАБ).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cui L., Ma X., Sato K., Okuma K., Tenover F.C., Mamizuka E.M., Gemmell C.G., Kim M.-N., Ploy M.-C., Soih N.E., Ferraz V., Hiramatsu K.* Cell wall thickening is common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41. N. 1. – P. 5–14.

2. *Biavasco F., Vignaroli C., Varaldo P.E.* Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2000. – V. 19. N. 6. – P. 403–417.

3. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 394 с.

4. *Коробов В.П., Полюдова Т.В., Филатова Л.Б., Лемкина Л.М., Панькова Н.В.* Активация аутолитической активности бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 низкомолекулярным катионным пептидом варнерином // Микробиология. – 2010. – Т. 79. № 1. – С. 133–135.

5. *Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г., Лукин И.Н., Грудинина С.А.* Практические аспекты современной клинической микробиологии. – М.: Триада, 2004. – 312 с.

Marakov E.A., Kononova L.I., Korobov V.P.

PRODUCTION OF VANCOMYCIN-RESISTANT STRAIN *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* 33 AND ITS SPECIFIC PROPERTIES

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia,

kononova_l@iegm.ru

Summary. A method is presented where the production of the laboratory strain *S. epidermidis* 33 Van^r with high vancomycin resistance is based on successive passages of the initial strain *S. epidermidis* 33 on liquid and solid nutritional media using elevating antibiotic concentrations. Specific features of resulting *S. epidermidis* 33 Van^r appear to be increased size of bacterial cells, poor biomass accumulation and decrease in growth rate under the cultivation on a liquid nutritional medium, as well as improving of resistance to lysozyme and cationic low-molecular weight peptide warnerin.

Key words: *Staphylococcus*, vancomycin, resistance, lysozyme, warnerin.

УДК 547.915+ 577.115– 577.18

Николаевич В.А.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ N–АЦИЛСФИНГОЗИНФОСФОЭТАНОЛА И СВОЙСТВА ЛИПОСОМ НА ЕГО ОСНОВЕ

Государственное научное учреждение "Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси",

г. Минск, Республика Беларусь, Nikolaevich@iboch.bas-net.by

Резюме. Синтезирован новый липид N-ацилсфингозинфосфоэтанол и получены липосомы на его основе. Липосомы имеют меньший размер, эффективно включают лекарственные вещества, более устойчивы к пероксидному окислению и ферментам крови, чем липосомы на основе фосфатидилхолина.

Ключевые слова: липосомы, сфингомиелин, церамид, доксорубицин, милтефозин.

Введение

В последние годы липосомы широко используются в качестве средств направленной доставки лекарственных соединений к клеткам-мишеням. Важными требованиями, предъявляемыми к липосомам, являются их небольшой размер, позволяющий при введении избежать закупорки капилляров, устойчивость к действию ферментов крови и способность эффективно инкапсулировать лекарственные соединения. В данной работе синтезирован новый липид – N-ацилсфингозинфосфоэтанол (АСФЭ) и изучены свойства липосом на его основе. Такой липид является аналогом фосфатидилэтанола (ФЭт) – эффективного компонента для встраивания лекарственных соединений в липосомы [1], но в отличие от последнего не является субстратом фосфолипаз типа А, содержащихся в крови.

Материалы и методы исследования

Синтез АСФЭ. Сфингомиелин (СМ) из мозга свиньи растворя-

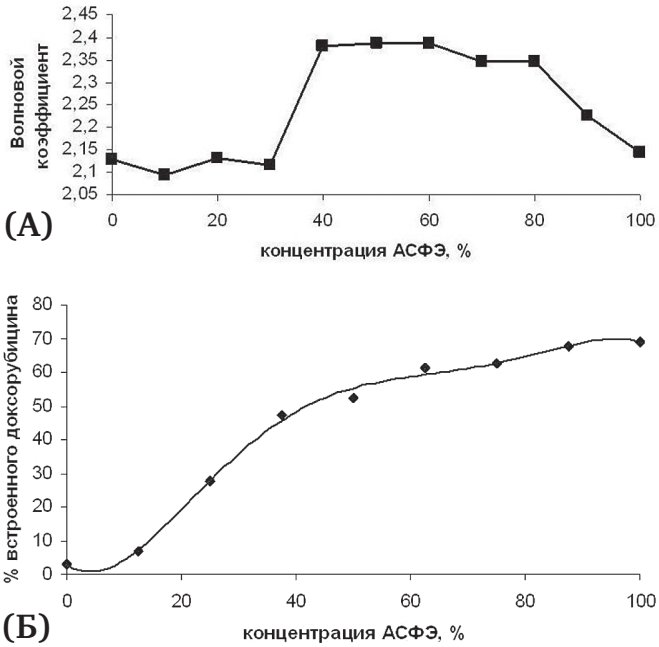


Рис. 1. Зависимость волнового коэффициента от состава липосом (А), зависимость встраивания доксорубицина в липосомы от содержания липидов (Б).

ли в хлороформе, добавляли 200 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 5,6), содержащего 40 мМ $CaCl_2$ и этанол, смесь диспергировали ультразвуком, затем добавляли фосфолипазу D из *Streptomyces netropsis* и перемешивали при 35°С в течение 10 ч. Затем переносили реакционную смесь в делительную воронку и добавляли хлороформ и метанол. Нижний слой отделяли, упаривали досуха с толуолом и образовавшийся АСФЭ очищали хроматографией на силикагеле. Выход АСФЭ составлял 70%.

Приготовление липосом. Раствор фосфолипидов в хлороформе упаривали на роторном испарителе, затем на масляном насосе в течение 5 мин. К полученной пленке прибавляли 0,05М натрий-фосфатного буферного раствора (pH 7,4) и инкубировали в течение 30 мин, периодически встряхивая. Затем полученную суспензию обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость, содержащую липосомы, отделяли от осадка.

Измерение волнового коэффициента. Заранее приготовленную суспензию липосомальных частиц переносили в фотометрическую кювету и измеряли поглощение при разных длинах волн. Волновой коэффициент липосом определяли как тангенс угла наклона логарифмической зависимости оптической плотности от длины волны [2].

Измерение микровязкости. Для измерения микровязкости липидного бислоя к липосомам добавляли 10 мкл 0,6%-го раствора пирена в этиловом спирте. Затем измеряли соотношение интенсивности флуоресценции пирена при длинах волн 376 и 395 нм, длина волны возбуждения – 342 нм.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что липосомы на основе ФЭт эффективно включают лекарственные соединения [1]. В настоящей работе предпринята попытка ферментативного синтеза его сфингозинового аналога. СМ и его производные не подвергаются гидролизу фосфолипазами А, пероксидному окислению, так как содержат в своем составе преимущественно остатки насыщенных и моноеновых жирных кислот, а также служат субстратами для сфингомиелиназ, продуцирующих церамиды – индукторы апоптоза. Для синтеза АСФЭ был выбран ферментативный подход, основанный на реакции трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипазой D. Как правило, СМ является плохим субстратом для растительных и некоторых бактериальных фосфолипаз D, но оказалось, что фермент, полученный при культивировании штамма *Streptomyces netropsis* в Институте микробиологии НАН Беларуси, способен катализировать его превращение с высоким выходом. Структура АСФЭ подтверждена с помощью 1Н-ЯМР и масс-спектрометрии. Как АСФЭ, так и его смесь с СМ, легко диспергировались в воде с образованием липосом. С использованием спектротурбидиметрического метода была определена зависимость размера липосом от процентного соотношения компонентов – СМ и АСФЭ (рис. 1).

Как видно из рис. 1А, размер липосом резко уменьшался при содержании в составе смеси от 40 до 80% АСФЭ, что следует из роста волнового коэффициента, который был обратно пропорционален размеру липосом. На рис. 1Б приведены результаты инкапсулирования противоопухолевого антибиотика доксорубицина в липосомы, состоящие из СМ и АСФЭ. Видно, что высокая степень включения антибиотика в большом диапазоне содержания АСФЭ в составе липосом соответствовала их минимальному размеру. Гидрофобные соединения – гексадецилфосфохолин (милтефозин) и церамид в количестве до 20% от общего содержания фосфолипидов при включении в липосомы из смеси СМ и АСФЭ не приводили к существенным изменениям размера и физико-химического состояния наночастиц, по данным измерения волнового коэффициента и флуоресценции. Церамид несколько сильнее оказывал влияние на эти параметры, но не вызывал разрушения липосом в указанных концентрациях (данные не приведены).

Заключение

Новый липид N-ацилсфингозинфосфоэтанол в смеси со сфингомиелином образует липосомы, которые лишены многих недостатков обычных липосом: они не подвергаются пероксидному окислению, расщеплению фосфолипазами А крови, имеют меньший размер, эффективно включают препараты, относящиеся к разным классам веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kisel M.A., Kulik L.N., Tsybovsky I.S., Vlasov A.P., Kholodova E.A., Zabarovskaya Z.V.* Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat // Int. J. Pharmaceutics. – 2001. – V. 216. – N. (1-2). – P. 105—114.

2. *Хлебцов Н.Г., Ковлер Л.А., Хлебцов Б.Н., Загирова С.В., Богатырев В.А.* Спектро-турбидиметрический анализ взвесей липосом // Коллоидн. журн. – 2001. – Т. 63. № 5. – С. 538–546.

Nikolaevich V.A.

FERMENTATIVE SYNTHESIS OF N-ACYL-SPHINGOSINEPHOSPHOETHANOL AND PROPERTIES OF LIPOSOMES BASED ON IT

Institute of Bioorganic Chemistry, the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, Nikolaevich@iboch.bas-net.by

Summary. New lipid (N-acylsphingosinephosphoethanol) was synthesized and liposomes based on it were obtained. The liposomes have smaller size, improved incapsulation capacity, and are more stable against lipid peroxidation and blood enzymes than liposomes of phosphatidylcholine.

Key words: sphingomyelin, N-acylsphingosinephosphoethanol, liposomes, ceramide, doxorubicin, miltephosine.

УДК 579.66

Оленева М.А.[1], Максимова Ю.Г.[2]

ГЕТЕРОФАЗНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *RHODOCOCCUS RUBER* GT1 КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА ГИДРОЛИЗА НИТРИЛОВ

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия, kbisca@mail.ru; [2]Учреждение Российской Академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, maks@iegm.ru

Резюме. Биокатализатор гидролиза нитрилов был получен путем самоиммобилизации *Rhodococcus ruber* gt1 при культивировании с носителями. Его эффективность оценивали в реакции трансформации 3-цианопиридина в никотинамид. Наибольшее количе-

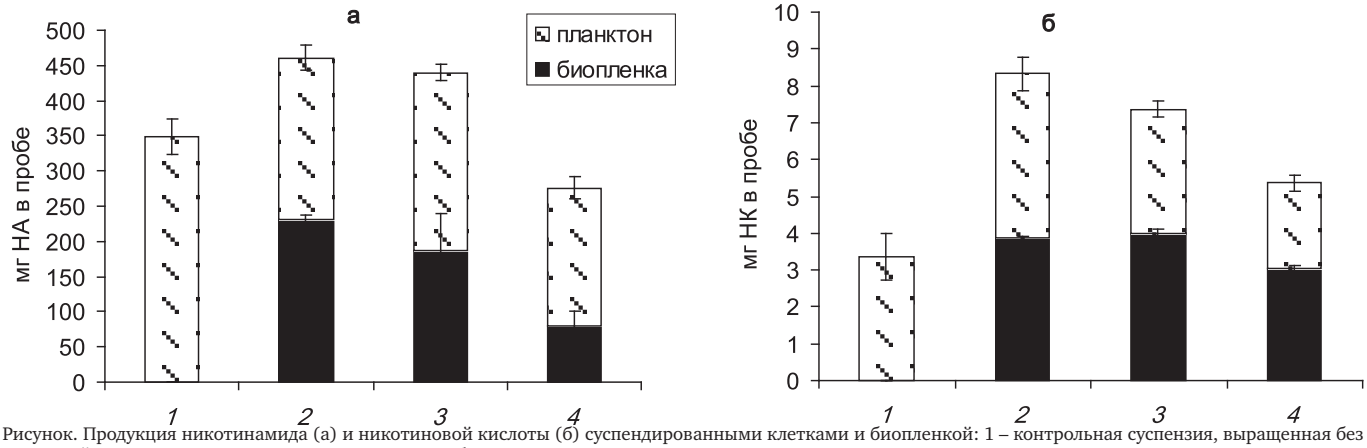


Рисунок. Продукция никотинамида (а) и никотиновой кислоты (б) суспендированными клетками и биопленкой: 1 – контрольная суспензия, выращенная без носителей; 2 – Урал ТМ–4; 3 – полипропилен; 4 – Карбопон–В–актив.

ство биомассы было получено при культивировании штамма с полипропиленом. Было показано, что при гетерофазном культивировании суммарный выход биомассы превышал контрольный в 6 раз, тогда как выход никотинамида – лишь в 1,3 раза. Конверсия 3-цианопиридина биопленкой менее эффективна, чем суспендированными клетками, что, вероятно, обусловлено диффузионными ограничениями в биопленке.

Ключевые слова: гетерофазное культивирование, биопленка, самоиммобилизация, никотинамид, никотиновая кислота.

Введение

По современным данным, более 99% бактериальных популяций в природных экосистемах существуют не в виде свободно плавающих планктонных клеток, а в виде специфически организованных прикрепленных к субстрату биопленок [1]. Эта способность микроорганизмов к образованию биопленок может играть не только отрицательную роль (антибиотикоустойчивость патогенных штаммов, биокоррозия), но и положительную – в биологической очистке сточных вод, отходящего газа и почв. Кроме того, биопленки промышленно значимых штаммов микроорганизмов могут рассматриваться как самоиммобилизующиеся и саморегенерируемые биокатализаторы, что особенно актуально в тех случаях, когда субстраты и/или продукты биокатализа отрицательно воздействуют на жизнеспособность клетки [2].

Целью данной работы явилось получение биокатализатора нитрильного гидролиза путем гетерофазного культивирования штамма *Rhodococcus ruber* gt1 с носителями и оценка продуктивности биокатализатора при трансформации 3-цианопиридина в никотинамид (НА) и никотиновую кислоту (НК).

Материалы и методы исследования

Штамм *R. ruber* gt1 (ИЭГМ 612, Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов, акроним ИЭГМ, www.iegm.ru/iegmcol/index.html) выращивали в течение 7 суток на минимальной среде с 0,1% глюкозы в качестве источника углерода и 10 мМ хлоридом аммония в качестве источника азота в присутствии носителей: Урал ТМ–4 (карбонизированные углеродные вискозные волокна), Карбопон–В–актив (активированные вискозные углеродные волокна), производства РУП "Светлогорское "Химволокно" (Беларусь) и полипропилена (пленка). В качестве биокатализатора конверсии 3-цианопиридина использовали суспендированные клетки и биопленку, выращенную на носителях. Трансформацию 400 ммоль 3-цианопиридина проводили в 10 мл фосфатного буфера. Концентрацию никотинамида и никотиновой кислоты определяли методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение

Показано, что общая продукция никотинамида и никотиновой кислоты, слагающаяся из продукции этих веществ биомассой суспендированных клеток (планктона) и биопленкой, полученными при гетерофазном культивировании, достоверно превышает таковую при конверсии контрольной биомассой, выращенной без носителей (рисунок). Исключение составляет лишь продукция никотинамида биопленкой, выращенной на носителе Карбопон-В-актив, что можно объяснить адсорбцией 3-цианопиридина и никотинамида на активированном материале.

Максимальный урожай клеток при гетерофазном культивировании с полипропиленовой пленкой составил 0,66 мг/мл планктона и 44 мг биопленки на 1 см^2 носителя, тогда как максимальный урожай клеток при культивировании без носителя – 0,83 мг/мл. Суммарный выход биомассы при гетерофазном культивировании с полипропиленом превышал контрольный в 6 раз, в то время как суммарный выход никотинамида при конверсии 3-цианопиридина всей полученной биомассой превышал контрольный лишь в 1,3 раза. В этом случае можно говорить о том, что гетерофазное культивирование дает возможность получить больше биомассы на единицу потребленного ростового субстрата (в данном случае глюкозы) и позволяет получить два вида биокатализатора – суспендированный и самоиммобилизованный на носителях. Но при этом конверсия 3-цианопиридина биопленкой менее эффективна, чем суспендированными клетками, что, вероятно, обусловлено диффузионными ограничениями в биопленке.

Следует отметить, что применение биопленок в биокатализе остается спорным вопросом, т.к. преимущества, заключающиеся в самоиммобилизации, долговременной активности и высокой устойчивости к токсичным веществам, сочетаются с флуктуациями в продуктивности и качестве продукта, обусловленными сложной и динамичной природой биопленок. Кроме того, возможно образование избытка внеклеточных полимерных веществ, приводящее к ограничениям массопереноса и загрязнению реактора [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке АВЦП "Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2011 гг.)", проект № 2.1.1/12133.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445-1456.

2. Rosche B., Li X.Z., Hauer B., Schmid A., Buehler K. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis // Trends Biotechnol. – 2009. – V. 27. – N. 11. – P. 636-643.

Oleneva M.A.[1], Maksimova Yu.G.[2]

HETEROPHASE CULTIVATION OF *RHODOCOCCUS RUBER* GT1 AS A METHOD FOR OBTAINING IMMOBILIZED BIOCATALYST OF NITRILE HYDROLYSIS

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, kbisca@mail.ru; [2]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia, maks@iegm.ru

Summary. The biocatalyst of nitrile hydrolysis was obtained by self-immobilization of *Rhodococcus ruber* gt1 under cultivation with supports. Its effectiveness was evaluated in the reaction of 3-cyanopyridine transformation to nicotinamide. The greatest amount of biomass was obtained by culturing strain with polypropylene. It was shown that under heterophase cultivation the total yield of biomass is more up to 6 times than the control and the yield of nicotinamide - 1.3 times. Conversion of 3-cyanopyridine by biofilms is less effective than suspended cells, which is probably due to diffusion limitations in biofilms.

Key words: geterophase cultivation, biofilm, self-immobilization, nicotinamide, nicotinic acid.

УДК 593.1:577.21

Разумова Ю.В.[1] , *Чересиз С.В.*[2], *Кочетов А.В.*[3], *Беклемишев А.Б.*[1]

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКА GAG ВИЧ-1, СЛИТОГО С ЖЕЛТЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ, В КУЛЬТУРЕ *LEISHMANIA TARENTOLAE*

[1]Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биохимии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск, Россия, julika@ngs.ru, beklem@soramn.ru; [2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”, г. Новосибирск, Россия, cheresiz@yandex.ru; [3]Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия, ak@bionet.nsc.ru

Резюме. В настоящей работе нами получен штамм *Leishmania tarentolae*, продуцирующий полноразмерный белок Gag ВИЧ-1, слитый с eYFP. Химерный белок Gag-eYFP наблюдался методом флюоресцентной микроскопии в живых клетках и определялся флюорометрически в суспензии клеток. Результаты проведенной работы показывают возможность использования eYFP в качестве флюоресцентного маркера для детекции целевого белка в клетках *Leishmania tarentolae* в условиях *in vivo* .

Ключевые слова: *Leishmania tarentolae,* рекомбинантный белок, ВИЧ, eYFP.

В последние годы предпринято несколько успешных попыток использования безопасного для человека и млекопитающих вида простейшего — *Leishmania tarentolae* для получения рекомбинантных белков [1, 2]. Жизненный цикл этого паразита включает двух хозяев: ящериц (внутриклеточное существование паразита в форме амастигот) и москитов (паразиты размножаются в пищеварительном тракте, промастиготная форма). Промастиготы интенсивно растут в суспензионной культуре на недорогих питательных средах и достигают высокой плотности. Посттрансляционные модификации белков *Leishmania tarentolae* соответствуют таковым у млекопитающих, в связи с чем использование этого микроорганизма в качестве системы экспрессии чужеродных генов предпочтительно по сравнению с широко используемыми для этих целей бактериями и дрожжами.

Структурный белок-предшественник Gag (p55) вируса иммунодефицита человека I типа (ВИЧ-1) является потенциально эффективным антигеном для создания вакцины против ВИЧ. Кроме того, была продемонстрирована возможность использования штамма *Leishmania tarentolae,* продуцирующего этот антиген, в качестве живой вакцины против ВИЧ [3], однако механизм внутриклеточного процессинга, транспорта и презентации мононуклеарными клетками этого антигена в данном случае не изучен. Поэтому представляет интерес получение штамма *Leishmania tarentolae* — продуцента рекомбинантного белка Gag, помеченного легко детектируемым маркером для обнаружения этого антигена *in vivo*.

В данной работе нами был получен штамм *Leishmania tarentolae*, продуцирующий полноразмерный белок Gag ВИЧ-1, слитый с желтым флюоресцентным белком (eYFP). В работе была использована коммерческая система LEXSinduce2 Expression Kit (производитель Jena Bioscience, Германия), представляющая собой генетически модифицированный штамм *Leishmania tarentolae*_T7-TR (конститутивно экспрессирующий гены РНК-полимеразы бактериофага T7 и TET репрессора), и челночный вектор pLEXSY_I-neo2 с полилинкером для встройки целевого гена и его экспрессии под контролем T7 промотора/TET оператора. Кодирующая область гена Gag, слитая с кодирующей последовательностью гена eYFP, была встроена и клонирована в составе вектора pLEXSY_I-neo2 в клетках *E.coli*. Клонирование и индукцию экспрессии химерного гена *gag-eyfp* проводили согласно инструкции фирмы-производителя системы. Выделенная плазмида была линеаризована гидролизом эндонуклеазой рестрикции SwaI, и полученная экспрессионная кассета была встроена в хромосомный локус *odc* штамма *Leishmania tarentolae*_T7-TR с использованием электропорации. Селекцию трансфицированных клеток проводили с использованием неомицина. Индукцию тетрациклином экспрессионной кассеты, интегрированной в хромосому клетки-хозяина, проводили в ранне-логарифмической фазе роста клеток, а выявление химерного белка Gag-eYFP - в позднелогарифмической фазе. Клетки осаждали центрифугированием, промывали фосфатно-солевым буфером и ресуспендировали в нужном объеме этого буфера. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфицированные клетки *Leishmania tarentolae*_T7-TR. С использованием флюоресцентного микроскопа, мы наблюдали яркое свечение подвижных живых клеток, отсутствующее в контрольных клетках. При флюориметрическом анализе трансфицированных клеток (возбуждение длиной волны 514 нм) мы регистрировали четкий, характерный для eYFP спектр испускания с максимумом при 527 нм. Высота пика составила 300 относительных флюоресцентных единиц. При аналогичных условиях в контрольном образце наблюдалась незначительная автофлюоресценция (интенсивностью порядка 3-х единиц) в виде плато. Наличие белка Gag в трансфицированных клетках было подтверждено методом твердофазного ИФА с использованием моноклональных антител к этому белку.

Результаты проведенной работы демонстрируют возможность использования eYFP в качестве флюоресцентного маркера для детекции рекомбинантного белка в клетках *Leishmania tarentolae* в условиях *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Breitling R.*, *Klingner S.*, *Callewaert N. et al*. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production // Expr. Purif. – 2002. – V. 25. – P. 209-218.

2. *Basile G.*, *Peticca M*. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae* // Mol. Biotechnol. – 2009. – V. 43. – P. 273-278.

3. *Breton M.*, *Zhao C.*, *Ouellette M. et al*. A recombinant non-pathogenic *Leishmania vaccine* expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection // J. Gen. Virol. – 2007. – V. 88. – P. 217-225.

Razumova Ju.V.[1], *Cheresiz S.V.*[2], *Kochetov A.V.*[3], *Beklemishev A.B.*[1]

PRODUCTION OF RECOMBINANT HIV-1 GAG POLYPROTEIN FUSED TO YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (EYFP) IN *LEISHMANIA TARENTOLAE*

[1] Research Institute for Biochemistry SB RAMS, Novosibirsk, Russia, julika@ngs.ru , beklem@soramn.ru; [2] National Research University Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia, cheresiz@yandex.ru; [3] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, ak@bionet.nsc.ru

Summary. We report on the expression of a chimeric protein containing the yellow fluorescent protein (eYFP) fused to the C-terminus of a full-length HIV-1 Gag protein in *Leishmania tarentolae.* The chimeric Gag-eYFP protein was detectable in living cells by fluorescence microscopy, and its presence in the cell suspension was confirmed by spectral fluorometry. This study demonstrates that eYFP can be employed as reporter for an *in vivo* detection of the expressed recombinant protein in the *Leishmania tarentolae* cells.

Key words: *Leishmania tarentolae*, recombinant protein, HIV-1, eYFP.

УДК 573.6.086.835:579.8

Сырвачева Д.А.[1], Жила Н.О.[2]

СИНТЕЗ СРЕДНЕЦЕПОЧЕЧНЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

[1]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский федеральный университет", г. Красноярск, Россия, Syrvacheva-1989@yandex.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт биофизики Сибирского отделения РАН, г. Красноярск, Россия, lhab@ibp.ru

Резюме. Исследован режим биосинтеза полигидроксиалканоаты (ПГА) для направленного получения образцов заданного состава. Получение более биотехнологичных материалов является одним из перспективных направлений современной экологии, биотехнологии и биомедицины. Объектом исследований явились водородные бактерии *Ralstonia eutropha* штамм B5786. Для получения сополимера 3-гидроксибутирата-со-3-гидроксигексаноата (поли(3ГБ-со-3ГГ)) в автотрофных условиях в качестве источника 3-гидроксигеканоата использовали соли гексановой кислоты, в гетеротрофных условиях источником углерода служила фруктоза. Масштабировали эксперимент в ферментере, за основу была принята солевая среда Шлегеля. В итоге были разработаны и реализованы режимы биосинтеза, позволившие синтезировать сополимеры поли(3ГБ-со-3ГГ) с различным содержанием 3ГГ.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, синтез, полимер, биомасса, 3-гидроксигексаноат.

Полиэфиры микробного происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА) вызывают все больший интерес среди микробиологов, биотехнологов и материаловедов в связи с их свойством разрушаться в природной среде без образования токсичных продуктов, а также из-за возрастающих требований к охране окружающей среды. Основными тенденциями в современной индустрии полимеров является создание новых экологически чистых полимерных материалов с широким спектром полезных свойств. В этой связи большую актуальность приобрели работы по биополимерам (полимерам биологического происхождения). В ходе разработки эффективных способов синтеза ПГА существенное внимание уделяется бактериям *Ralstonia eutropha* в связи со способностью аккумулировать ПГА с высокими выходами на различных субстратах. Способность организма синтезировать различные сополимеры вызывает большой интерес в связи с возможностью направленного получения полимеров с заданными свойствами. Сополимеры 3-гидроксибутирата-со-3- гидрогксигексаноата (поли(3ГБ-со-3ГГ)) отличаются по физико–химическим свойствам, они менее кристалличны, характеризуются более низкой температурой плавления.

Целью настоящей работы было исследование способности бактерий штамма *R. eutropha* B5786 синтезировать в автотрофных и гетеротрофных условиях поли(3ГБ-со-3ГГ).

Проведено культивирование бактерий на смешанном углеродном субстрате, содержащем углекислоту и добавки соли гексановой кислоты. В ходе эксперимента в растущую при дефиците азота автотрофную культуру *R. eutropha* B5786, аккумулирующую полимер, вносили добавки гексановой кислоты в концентрации 0,5 г/л. Выход полимера при единовременной подаче гексаноата был максимальным, по сравнению с режимом дробного дозирования, и составил 50% от веса сухой биомассы. Наличие 3-гидроксигексаноата (3ГГ) выявлено во всех пробах, величина включения этого мономера составила 3 мол.%. Используя дробную подачу соли 3-гексановой кислоты в среду и увеличивая последующее время культивирования бактерий, удалось повысить содержание фракции 3-ГГ до 6 мол.% после первой добавки гексаноата и до 9 мол.% - после второй. Однако общий выход полимера при этом составил 46% от веса сухой биомассы.

Проведено культивирование бактерий в гетеротрофных условиях с добавлением акриловой кислоты, являющейся, как известно, ингибитором в-окисления жирных кислот. В связи с токсичностью данного вещества для бактерий, максимальная концентрация акрилата в культуре не превышала 1 г/л. Исследовано влияние различных концентраций акрилата (0.1, 0.5 и 1.0 г/л) на рост и синтез полимера у данного штамма при культивировании на фруктозе (основной субстрат) и гексановой кислоте (ко-субстрат). Показано, что с увеличением концентрации акрилата натрия доля 3ГГ в сополимере возрастала от 9 мол% до 51 мол%. Добавление акрилата натрия приводило к снижению биомассы, но не влияло на содержание полимера в клетке. Кроме того, установлено, что максимальное содержание 3ГГ в сополимере наблюдали в эксперименте, когда подачу гексановой кислоты и акрилата натрия осуществляли в период активного синтеза полимера и при отсутствии в среде основного субстрата – фруктозы.

Таким образом, установлено, что исследуемый штамм способен синтезировать сополимер 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата в автотрофных и гетеротрофных условиях при условии добавления в культуру гексановой кислоты (предшественника для синтеза мономеров 3ГГ). Показано, что гетеротрофные условия культивирования по сравнению с автотрофными обеспечивают более высокие урожаи выхода биомассы (до 3 г/л), выходы полимера (54% и 46% соответственно) и включения фракции 3ГГ (51 мол.% и 9 мол.% соответственно).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов») и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 96).

Syrvacheva D.A.[1], Zhila N.O.[2]

SYNTHESIS OF MEDIUM-CHAIN-LENGTH POLYHYDROXYALKANOATE

[1]Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia, Syrvacheva-1989@yandex.ru; [2]Institute of Biophysics, Krasnoyarsk, Russia, lhab@ibp.ru

Summary. Biosynthesis of PHAs to obtain samples of given composition was studied. The object of study was hydrogen-oxidizing bacteria *Ralstonia eutropha* strain B5786. 3-hydroxybutyrate–co-3-hydroxyhexanoate (poly(3HB-co-3HHx) copolymers were obtained under heterotrophic (substrate fructose) and autotrophic conditions using hexanoic acid as co-substrate. fructose. As a result, poly(3-HB-co-3-HHx) copolymers with different 3HHx content were obtained.

Key words: polyhydroxyalkanoates, synthesis, polymer, biomass, 3-hydroxyhexanoate.

УДК 57.088.6+615.322

Тарасова Е.В.[1], Гришко В.В.[2], Ившина И.Б.[1]

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ 3-ОКСОБЕТУЛИНА – КЛЮЧЕВОГО ИНТЕРМЕДИАТА В СИНТЕЗЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

[1]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, ivshina@iegm.ru; [2]Учреждение Российской академии наук Институт технической химии Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, grishko@aport.ru

Резюме. Продукты микробиологической трансформации бетулина обладают мультимедикаментозной активностью. В качестве противоопухолевых агентов перспективны 2,3-секопроизводные бетулина, химический синтез которых осуществляется с помощью последовательной модификации молекулы 3-оксобетулина. Исследован процесс направленного биоокисления бетулина в 3-оксобетулин с участием интактных клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66. Установлено, что наиболее эффективная биоконверсия бетулина протекала с использованием покоящихся клеток родококков, предварительно выращенных в мясопептонном бульоне. Продолжительность процесса ферментации бетулина составляла 2 сут, при этом регистрировался 40% выход целевого 3-оксопроизводного.

Ключевые слова: бетулин, биотрансформация, родококки, 3-оксобетулин.

Введение

Поиск новых биологически активных соединений и разработка лекарственных препаратов на их основе – актуальная задача современной фармакологии. В качестве стартового соединения для получения фармацевтических субстанций широко используется доступный растительный тритерпеноид бетулин, окисленные производные которого проявляют противовоспалительную, гепапротекторную, противоопухолевую, противовирусную, антималярийную и антибактериальную активность [1]. Синтез цитотоксически активных А-секопроизводных бетулина основан на химической модификации молекулы 3-оксобетулина. Однако химические методы не позволяют эффективно осуществлять направленное окисление вторичной гидроксильной группы бетулина с образованием соответствующего 3-оксопроизводного. Цель настоящей работы – оценка возможности использования актинобактерий рода *Rhodococcus* для окислительной биотрансформации бетулина.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 55 штаммов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, www.iegm.ru/iegmcol), принадлежащих к видам *R. erythropolis*, "*R. longus*", *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* [2]. Бактерии культивировали в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,02; $FeCl_3$ – 0,001. Бетулин получали путем экстракции бересты смесью изопропанола и воды (9:1) с последующей его перекристаллизацией и добавляли 500 мг/л в среду культивирования в виде раствора в 5 мл диметилсульфоксида. Для повышения биодоступности бетулина в качестве дополнительных ростовых субстратов использовали глюкозу (1,0%), глицерин (1,0%) или *н*-гексадекан (0,1; 1,0; 3,0 об.%), при этом бетулин добавляли через 2 сут роста родококков. Для получения покоящихся клеток родококки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне, а также жидкой минеральной среде в присутствии глюкозы (1,0%), *н*-гексадекана (1,0 об.%) или глицерина (1,0%) в течение 2 сут, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осажденную биомассу трижды промывали Na-фосфатным буфером и ресуспендировали в 100 мл Na-фосфатного буферного раствора (pH 7). В качестве посевного материала использовали родококки (5,0 x 10^5 кл/мл) в экспоненциальной фазе роста на мясопептонном агаре.

Бетулин и продукты его биоконверсии экстрагировали из культуральной жидкости с помощью этилацетата и регистрировали методом тонкослойной хроматографии с использованием пластин с силикагелем 60 F_{254} ("Merk", Германия) в подобранной опытным путем системе растворителей этилацетат-петролейный эфир (1:4) – по объему. Идентификацию зон исследуемых веществ проводили в результате обработки пластин 5% H_2SO_4 и их последующего прогревания в течение 2-3 мин при 95-100°С. Количественный анализ осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа Agilent 6890N ("Agilent Technologies", США) с кварцевой колонкой HP-5MS SN US 15189741-1 и квадрупольным масс-спектрометром MSD 5973 в качестве детектора.

Результаты и обсуждение

Все исследованные штаммы родококков не способны использовать бетулин в качестве единственного источника углерода и энергии. Направленное окисление вторичной гидроксильной группы бетулина с образованием до 25-30% соответствующего 3-оксопроизводного протекало лишь в присутствии дополнительных ростовых субстратов (глицерина, глюкозы или *н*-гексадекана, в частности). Среди коллекционных культур родококков, использованных в работе, наибольшую каталитическую активность в отношении бетулина проявлял штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66.

Как видно из таблицы, присутствие 3,0 об.% *н*-гексадекана в инкубационной среде обусловливает наиболее высокий (свыше 70%) выход 3-оксобетулина. При этом продолжительность процесса биотрансформации бетулина составляла 10 сут, а дальнейшее использование образующегося целевого продукта было сопряжено с проблемой его отделения от остаточного *н*-гексадекана.

Известно, что применение покоящихся бактериальных клеток имеет ряд преимуществ по сравнению с растущей культурой, как то: возможность многократного использования биомассы в высоких концентрациях, снижение риска нежелательного бактериального загрязнения в процессе биотрансформации, ускорение процесса выделения и очистки продуктов биотрансформации [3, 4]. На рис. 1 представлены результаты биотрансформации бетулина покоящимися клетками родококков. По нашим данным, наиболее эффективная биоконверсия бетулина в соответствующее 3-оксопроизводное протекала при использовании родококков, предварительно выращенных в мясопептонном бульоне. В этих условиях содержание целевого 3-оксобетулина среди продуктов трансформации составляло 40%, а продолжительность процесса биотрансформации сокращалась с 10 до 2 сут.

Таблица.

Биотрансформация бетулина с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 66

Дополнительный ростовой субстрат	Содержание, %	Содержание в сумме продуктов реакции, %	
		бетулин	3-оксобетулин
Контроль	–	100	–
Глюкоза	1,0	92,5	7,5
Глицерин	1,0	74,6	25,4
н-Гексадекан	0,1	65,0	35,0
н-Гексадекан	1,0	48,0	44,9
н-Гексадекан	3,0	27,8	72,2

Примечание. Использованы активно растущие клетки родококков.

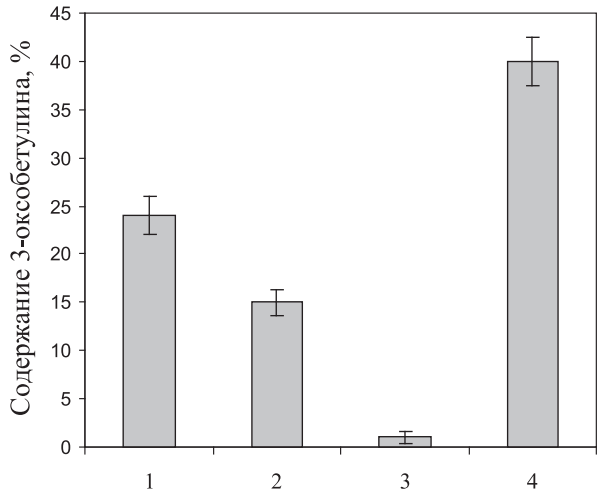


Рис. 1. Биотрасформация бетулина покоящимися клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, предварительно выращенными в минеральной среде в присутствии н-гексадекана (1), глюкозы (2), глицерина (3) и мясопептонном бульоне (4).

Выводы

1. Представители актинобактерий рода *Rhodococcus* (*R. erythropolis*, "*R. longus*", *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*) не использовали растительный тритерпеноид бетулин в качестве единственного источника углеродного питания и энергии.

2. Биотрансформация бетулина с образованием 3-оксобетулина протекала в течение 10 сут в присутствии косубстратов (глюкоза, глицерин или *н*-гексадекана) в инкубационной среде, при этом максимальный (свыше 70%) выход целевого продукта обнаруживался в присутствии 3,0 об.% *н*-гексадекана.

3. Применение покоящихся клеток, предварительно выращенных в богатой питательной среде (в мясопептонном бульоне), обеспечивало высокий выход 3-оксопроизводного бетулина и сокращение продолжительности процесса биоконверсии с 10 до 2 сут.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности, инноваций и науки Пермского края (№ 11-04-96012-р_урал_а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Биологическое разнообразие" номер гос. регистрации 01200963679) и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (государственный контракт № 16.518.11.7069).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г.* Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – № 13. – С. 1–30.

2. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collections of Alkanotrophic Microorganisms. 28.09.2011 (www.iegm.ru/iegmcol).

3. *Wang Z., Zhao F., Chen D., Li D.* Biotransformation of phytosterol to

produce androsta-diene-dione by resting cells of *Mycobacterium* in cloud point system // Process Biochemistry. – 2006. – V. 41. – P. 557–561.

4. *Cruz A., Fernandes P., Cabral J.M.S., Pinheiro H.M.* Solvent partitioning and whole-cell sitosterol bioconversion activity in aqueous-organic two-phase systems // Enzyme Microb. Technol. – 2004. – V. 34. – P. 342–353.

Tarasova E.V.[1], *Grishko V.V.*[2], *Ivshina I.B.*[1]

BIOCATALYTIC PRODUCTION OF 3-OXOBETULIN, A KEY INTERMEDIATE IN THE SYNTHESIS OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, ivshina@iegm.ru; [2]Institute of Technical Chemistry, Perm, Russia, grishko@aport.ru

Summary. Products of microbiological transformations possess multi-pharmacological activities. The 2,3-seco derivatives of betulin are considered as promising anticancer agents, which are chemically synthesized via a sequential modification of a 3-oxobitulin molecule. The process of directed betulin oxidation to 3-oxobitulin using intact *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 cells was studied. It was determined that the most efficient betulin bioconversion was achieved using resting *Rhodococcus* cells pre-grown in a nutrient medium. The duration of betulin fermentation process was 2 days with 40% yield of the desired product**Key words:** betulin, biotransformation, rhodococci, 3-oxobetulin.

Key words: betulin, biotransformation, rhodococci, 3-oxobetulin.

УДК 579.222

Четина О.А.[1,2], *Крылова И.О.*[1,2], *Кирьянова И.Н.*[2], *Максимов А.Ю.*[1,3], *Долгих Н.П.*[1,3]

НИТРИЛГИДРАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В ПРОЦЕССЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

[1]Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия, lymar11@rambler.ru; [2]Естественнонаучный институт Пермского государственного национального исследовательского университета, г. Пермь, Россия, bactericid@yandex.ru; [3]Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия, alm@iegm.ru

Резюме. Нитрилконвертирующие микроорганизмы являются перспективными объектами биотехнологии получения амидов и карбоновых кислот из соответствующих нитрилов. Представлены результаты исследования нитрилгидратазной активности у почвенных плесневых грибов в процессе биотрансформации производных карбоновых кислот.

Ключевые слова: микромицеты, ацетамид, ацетонитрил, этилацетат, нитрилгидратаза.

Введение

Известно, что нитрилконвертирующие микроорганизмы являются перспективными объектами биотехнологии получения амидов и карбоновых кислот из соответствующих нитрилов [1]. Нитрилы карбоновых кислот (органические цианиды) – органические соединения, содержащие одну или несколько цианогрупп –C≡N, связанных с органическим радикалом. Для микроорганизмов характерны два основных пути метаболизма нитрилов: (1) одностадийный гидролиз, осуществляемый ферментом нитрилазой с образованием соответствующей кислоты; (2) гидратация ферментом нитрилгидратазой до амида с последующим гидролизом амидазой амида до кислоты [2].

Цель настоящей работы – исследование нитрилгидратазной активности в процессе биотрансформации производных карбоновых кислот у почвенных плесневых грибов.

Таблица.

Виды плесневых грибов, трансформирующие специфические субстраты

Вид плесневого гриба	Тип специфического субстрата		
	Ацетамид	Ацетонитрил	Этилацетат
Cladosporium herbarum	+	–	–
Arthrinium phaeospermum	+	–	–
Acremonium spp.	+	+	–
Aspergillus fumigatus	+	–	–
Penicillium solitum	+	+	+
Aphanocladium album	+	+	–
Blastomyces spp.	–	–	+
Humicola grisea	–	–	+
Scopulariopsis spp.	–	–	+
Arthrobotrys oligospora	+	+	–
Cladosporium brevi-compactum	+	+	+
Cladosporium cladosporioides	+	+	–
Fusarium oxysporum	+	+	–

Примечание. «–»– Отсутствие роста на специфическом субстрате; «+» - отмечен рост микромицета на специфическом субстрате.

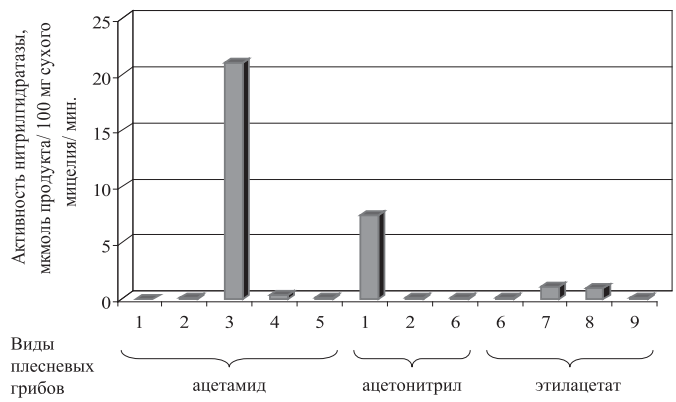
Материалы и методы исследования

В работе использованы штаммы плесневых грибов, выделенные из природных (редкие серо-гумусовые на пермских слоистых гипсово-карбонатных породах) и техногенно-измененных (абралиты) почв. Определение способности микромицетов трансформировать специфические субстраты производили путем посева на среду, состоящую только из солевой основы N и 1 мл специфического субстрата (ацетамид, ацетонитрил или этилацетат) в качестве единственного источника углерода и азота. Нитрилгидратазную активность определяли на 6-е сут после посева спор спектрофотометрически по изменению концентрации амида в реакционной среде за 10 мин трансформации при λ=260 нм в начале и в конце реакции. Продукты реакции анализировали методами газовой хроматографии и ВЭЖХ. Единица нитрилгидратазной активности соответствует 1 мкМ амида/100 мг сухого мицелия/мин.

Результаты и обсуждение

У выделенных плесневых грибов отмечена способность к росту при использовании ацетамида, ацетонитрила и этилацетата в качестве единственного источника углерода и азота (таблица).

У культур плесневых грибов, способных расти на среде с добавлением специфических субстратов, была определена нитрилгидратазная активность (рисунок). В качестве продукта метаболизма был



1. Aphanocladium album	*4. Aspergillus fumigatus*	*7. Blastomyces* spp.
2. Cladosporium cladosporioides	*5. Cladosporium herbarum*	*8. Arthrobotrys oligospora*
3. Fusarium oxysporum	*6. Penicillium solitum*	*9. Cladosporium brevi-compactum*

Рисунок. Нитрилгидратазная активность почвенных плесневых грибов, выращенных на различных субстратах (с содержанием разных производных карбоновых кислот).

идентифицирован ацетамид.

Не у всех исследованных плесневых грибов, способных расти на среде с добавлением специфических субстратов, обнаружена нитрилгидратазную активность. Это может быть связано с несовпадением пика активности фермента у микромицета в процессе роста и условиями проведения эксперимента. Максимальной нитрилгидратазной активностью отличились представители *Fusarium oxysporum*, выращенные в присутствии ацетамида, и *Aphanocladium album*, выращенные на среде с ацетонитрилом.

По нашим данным, все исследованные плесневые грибы показали низкую (менее 500 мкМ амида/100 мг сухого мицелия/мин) нитрилгидратазную активность [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Демаков В.А.* Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилутилизирующих бактерий *Rhodococcus ruber* GT1 и *Pseudomonas fluorescens* C2, иммобилизованными в структуре геля агарозы // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2009. – Вып. 10(36). – С. 111–114.

2. *Knowles C.J., Collins P.A.* The utilization nitriles and amides by *Nocardia rhodochrous* // J. Gen. Microbil. – 1983. – V. 129. – P. 711–718.

3. *Демаков В.А., Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Ремезовская Н.Б., Максимова Ю.Г.* Биологическое разнообразие нитрилметаболизирующих бактерий антропогенно-измененных почв Пермского края // Экология. – 2007. – Вып. 3. – С. 1–6.

Chetina O.A.[1,2], Krylova I.O.[1,2], Kiryanova I.N.[2], Maksimov A.Yu.[1,3], Dolgikh N.P.[1,3]

NITRILE HIDRATAZE ACTIVITY OF SOIL MICROMYCETES IN THE BIOTRANSFORMATION PROCESS OF CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES

[1]Perm State National Research University, Perm, Russia, lymar11@rambler.ru; [2]Natural Sciences Institute of Perm State National Research University, Perm, Russia, bactericid@yandex.ru; [3] Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of UB RAS, Perm, Russia, alm@iegm.ru

Summary. It is known that nitrile-converting microorganisms are perspective sources for production of amides and carboxylic acids from corresponding nitriles. The results obtained in the study on nitrile hydratase activity in soil mold fungi during biotransformation of carboxylic acid derivatives are presented.

Key words: micromycetes, acetamide, acetonitrile, ethyl acetate, nitrile hydratase

---

УДК 579.873.6.017.7

Шагабиева Ю.З., Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЕ

Учреждение Российской академии наук Институт химии нефти Сибирского отделения РАН, г. Томск, Россия, sli@ipc.tsc.ru

Резюме. Проведены исследования процессов биодеструкции углеводородов аборигенной микрофлорой при загрязнении почвы легкой и высоковязкой нефтями в концентрации 50 г/кг. С применением стимулирующего субстрата, численность почвенной микрофлоры возрастает на 3-4 порядка, увеличивается их ферментативная активность и на 60-е сут деструкция легкой нефти составляет 80,0 %, тяжелой – 72,4 %.

Ключевые слова: почвенная микрофлора, углеводороды, биодеструкция.

Освоение нефтяных месторождений приводит к загрязнению окружающей среды и негативному воздействию на человека, флору и фауну. В связи с этим, разработка способов рекультивации нефтезагрязненных почв – одна из важнейших задач при решении проблемы антропогенного воздействия на окружающую среду. Биотрансформация углеводородов, загрязняющих почву – процесс биохимический и является основой многих биотехнологий, направленных на улучшение экологических условий.

В течение 60 сут исследованы процессы биодеструкции углеводородов нефти, загрязняющих почву, стимулированной аборигенной микрофлорой. Загрязнение почвы проводили легкой нефтью Вахского месторождения и высоковязкой нефтью месторождения Тамсагбулаг (Монголия) с вязкостью 10 и 126 мПа·с при 20 °С соответственно. Концентрация загрязняющей нефти – 50 г/кг.

При загрязнении почвы нефтью в первые трое суток отмечено снижение численности микроорганизмов и активности почвенных ферментов в результате токсического действия углеводородов нефти. На 5-10-е сут происходит перестройка микробиоценоза почвы, при которой преимущество получает углеводородокисляющая группа микроорганизмов, способная усваивать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода. Видовое разнообразие микроорганизмов изменяется, доминируют микроорганизмы-деструкторы углеводородов, представители родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*.

Деструкция легкой нефти протекает с большей скоростью по сравнению с вязкой нефтью, которая наиболее устойчива к микробиологическому окислению. Оценка процессов биодеградации показала, что утилизация легкой нефти после 30 сут составила 16 %, тяжелой – 6,4 %. Одним из факторов, лимитирующих процесс трансформации углеводородов, является газовоздушный режим загрязненной почвы, поэтому через каждые 10 сут проводили рыхление почвы. Для интенсификации окислительных процессов применяли стимулирующие субстраты. С этой целью в почву вносили 5 %-ный раствор композиции на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ) и азотистых компонентов в концентрации 20 мл/кг почвы. Применение ПАВ, как стимулятора микробиологической активности, связано с диспергированием нефти, что ускоряет окислительные процессы распада нефтяных соединений. С применением стимулирующих факторов, численность почвенной микрофлоры возрастает на 3-4 порядка, увеличивается их ферментативная активность, на 60-е сут деструкция легкой нефти составляет 80,0 %, тяжелой – 72,4 %.

Способность микроорганизмов к деструкции углеводородов оценивали по изменению активности ферментов – дегидрогеназы, каталазы, полифенолоксидазы и пероксидазы (табл. 1).

Таблица 1.

Ферментативная активность нефтезагрязненной почвы

Ферменты	Исходная нефть	Активность после биодеструкции			
		Легкая нефть		Тяжелая нефть	
		30 сут	60 сут	30 сут	60 сут
Каталаза, мл/г	2,5	5,0	10,5	2,7	7,8
Дегидрогеназа, мг/г	0,21	0,41	0,70	0,30	0,55
Пероксидаза, мг/г	0,27	1,05	2,32	0,54	1,46
Полифенолоксидаза, мг/г	0,14	0,32	0,60	0,34	0,41

Дегидрогеназы принимают непосредственное участие в деструкции углеводородов, а высокоактивный кислород, образующийся при участии каталазы, обеспечивает активность окислительных процессов. Полифенолоксидазы играют важную роль в процессах гумификации, оказывают защитное действие, разлагая различные ксенобиотики [3]. Дегидрогеназы и полифенолоксидазы участвуют в окислении ароматических соединений нефти до хинонов и дальнейшей их конденсации в молекуле гумусовых веществ. Повышение активности изучаемых ферментов свидетельствует об интенсивном окислении углеводородов нефти в почве (табл. 1).

Анализ инфракрасных (ИК) спектров остаточных углеводородов нефти, экстрагированных из почвы после 60 сут деструкции, показал присутствие дополнительных полос поглощения (п.п.) в области 3350, 1710, 1740, 1170 см$^{-1}$, что указывает на накопление кислородсодержащих соединений. Полоса поглощения в области 1265 см$^{-1}$ свидетельствует об образовании ароматических альдегидов и кислот при микробном окислении алкилбензолов. Спектральные коэффициенты относительной интенсивности основных полос поглощения, характеризующие процессы трансформации углеводородов представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Спектральные коэффициенты исходного нефтезагрязнения почвы и после биодеградации стимулированной аборигенной микрофлорой

Спектральные коэффициенты	Легкая нефть			Тяжелая нефть		
	Исходная	После биодеградации		Исходная	После биодеградации	
		30 сут	60 сут		30 сут	60 сут
$C_1=D_{1610}/D_{720}$	0,77	1,31	2,34	0,29	0,60	1,42
$C_2=D_{750}/D_{720}$	1,11	1,16	3,49	0,49	0,63	0,73
$CH_3/CH_2=D_{1380}/D_{720}$	3,60	4,53	5,13	2,08	2,88	3,72
$C=O/C=C=D_{1710}/D_{1610}$	0,32	1,31	2,95	0,15	1,14	2,41
$C=O/CH_3=D_{1170}/D_{1380}$	0,15	0,32	0,28	0,08	0,26	0,43

На протяжении эксперимента происходит увеличение спектральных коэффициентов C_1 и C_2, что обусловлено резким уменьшением содержания насыщенных алканов, наиболее доступных для микробиологического окисления. Увеличение коэффициентов окисленности (C=O/C–C) и ($C=O/CH_3$) показывает накопление кислородсодержащих продуктов метаболизма при микробиологической трансформации углеводородов. Повышение коэффициента разветвленности (CH_3/CH_2) свидетельствует об относительном увеличении изо-алканов по отношению к н-алканам. Закономерное увеличение всех спектральных коэффициентов характеризует активность процессов трансформации углеводородов легкой и тяжелой нефтей стимулированной почвенной микрофлорой.

По данным ГЖХ на 60-е сут опыта полностью элиминировались парафины с длиной цепи C_9–C_{16}, на 90-97 % уменьшилось содержание углеводородов с длиной цепи C_{17}–C_{34}, как легкой, так и тяжелой нефтей.

Shagabieva Yu.Z., Svarovskaya L.I., Filatov D.A., L.K. Altunina

BIOTRANSFORMATION OF HYDROCARBONS IN OIL-CONTAMINATED SOIL

Institute of Petroleum Chemistry, Tomsk, Russia, sli@ipc.tsc.ru

Summary. We investigated biodestruction of hydrocarbons by aboriginal microflora at contamination of the soil with light and high-viscous oils at a concentration of 50 g/kg. Due to the use of a stimulating substrate, the number of the soil microflora was increased in 10^3-10^4 times, soil fermentative activity was also increased, and in 60 days the destruction of the light oil was 80.0 %, heavy oil – 72.4 %.

Key words: soil microflora, hydrocarbons, biodestruction.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

В журнале «Вестник Уральской медицинской академической науки» публикуются статьи проблемного характера, научные обзоры, лекции, отражающие важнейшие достижения в основных разделах медицинской науки. Решением Президиума ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата медицинских наук.

При направлении статьи в редакцию необходимо соблюдать следующие правила:

1. Статьи, присылаемые в редакцию, должны сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа.

2.Статьи направляются в редакцию в печатном виде (2 экз.) с подписями всех авторов и в электронном виде, на электронном носителе или по e-mail:vestnik-ural@mail.ru.

3. Формат предоставления статьи:

3.1. Номер УДК по международной библиотечно-библиографической классификации.

3.2. Фамилия(и) автора(ов) статьи, инициалы на русском и английском языках (Фамилия И. О.).

3.3. Название статьи на русском и английском языках.

3.4. Полное юридическое название учреждения, из которого вышла работа, страна, город на русском и английском языках.

3.5. Резюме (основное содержание работы объемом не более 0,5 стр.) на русском и английском языках.

3.6. Ключевые слова на русском и английском языках не более 5-и, через запятую.

3.7. Текст статьи.

Текст статьи и таблицы набираются в редакторе Word, диаграммы в редакторе Exel, рисунки в виде растровых или графических файлов: растровые (фото) с высоким разрешением (желательно 300 dpi) *.tif, *.jpg; графические (чертежи, схемы) *.cdr, *.ai, *.eps, *.wmf и др. Статья должна быть напечатана на одной стороне листа, 12 кеглем, с полуторным интервалом между строчками, с обычными полями. Размер статьи не должен превышать 15 стр., включая таблицы, диаграммы, рисунки и фотографии, которые должны быть напечатаны на отдельных листах. При наличии в статье цитат в сноске обязательно указывается источник цитаты (наименование, издание, год, том, выпуск, страница). Количество графического материала должно быть минимальным, не более 5 рисунков (диаграмм, фотографий). Рисунки не должны содержать текстовых надписей и обозначений, которые могут быть помещены в подписях под рисунками. Сокращение слов, имен, названий (кроме общепринятых) допускается только с первоначальным указанием полного названия. Специальные термины следует приводить в тексте в русской транскрипции.

3.8. Пристатейный список литературы.

Пристатейные ссылки и/или списки литературы следует оформлять в соответствии с требованиями «ГОСТ 7.0.5-2008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления».

3.9. В конце статьи обязательно указать контактное лицо для ведения оперативной редакционной переписки по статье - фамилия, имя, отчество, место работы и должность и контактная информация (мобильный телефон, e-mail).

3.10. К статье обязательно прилагается авторская справка на русском и английском языках.

Обязательные сведения:

а) фамилия, имя, отчество в следующем формате: Иванов Иван Иванович, Ivanov Ivan I;

б) полное название организации – места работы каждого автора в именительном падеже на русском и английском языках. Если все авторы статьи работают в одном учреждении – указать один раз;

в) адрес электронной почты для каждого автора (можно один для всех авторов);

г) корреспондентский почтовый адрес (с указанием страны и почтового индекса) для переписки с авторами статьи (можно один на всех авторов) на русском и английском языках.

4. Издание размещает электронную версию журнала в Интернете на сайте elibrary.ru (Научная электронная библиотека). Аннотации статей, ключевые слова, информация об авторах находятся в свободном доступе. Полнотекстовые версии статей находятся в платном доступе для подписчиков.

5. Плата с аспирантов за публикацию не взимается.

6. Все поступившие рукописи подлежат обязательному рецензированию. Экспертные заключения по результатам рецензирования редакция предоставляет авторам и по запросам экспертных советов в ВАК. Редакция оставляет за собой право на литературное редактирование статьи.

7. Направление в редакцию работ, которые уже напечатаны в других изданиях или же посланы для напечатания в другие редакции, не допускается.

8. Статьи, оформленные не по правилам, не рассматриваются.

Адрес редакции: 620014, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 12а, оф. 917
Наш сайт: http://vestnikural.ru
e-mail: vestnik-ural@mail.ru
Электронная версия журнала размещена на сайте www.elibrary.ru
Тел./факс (343) 310 03 06 (Диана Яковлевна Воинова, Карина Валериевна Шелепова)
Оформить подписку на журнал можно в почтовых отделениях на всей территории РФ.
Подписной индекс журнала в Каталоге Агентства Роспечать «Издания органов НТИ» – 66014.

I Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых учёных

«СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»

8-10 ноября 2011 г.

Уральское отделение Российской академии наук
Пермский научный центр УрО РАН
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
Пермский государственный национальный исследовательский университет
Министерство промышленности, инноваций и науки Пермского края
МОО «Микробиологическое общество»
Российское научное общество иммунологов
Всероссийская биологическая ассоциация «Симбиоз Россия»
Совет молодых учёных ИЭГМ УрО РАН

Уважаемые коллеги!
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский государственный национальный исследовательский университет и Совет молодых учёных ИЭГМ УрО РАН объявляют о проведении **8-10 ноября 2011 г.** Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых учёных «**Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии**»

Организационный комитет конференции

Председатели:
Черешнев В.А., акад. РАН и РАМН, д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, гл.н.с. ИЭГМ УрО РАН;
Демаков В.А., чл-корр. РАН, д.м.н., профессор каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, директор ИЭГМ УрО РАН
Макарихин И.Ю., д.ф-м.н., профессор, ректор ПГНИУ

Члены оргкомитета:
Ившина И.Б., чл-корр. РАН, д.б.н., профессор каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, зав. лаб. алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН
Шмагель К.В., д.м.н., профессор каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, зам. директора ИЭГМ УрО РАН
Ширшев С.В., д.м.н., профессор каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, зав. лаб. иммунорегуляции ИЭГМ УрО РАН
Литвиненко Н.И., к.б.н., профессор, декан биол. ф-та ПГНИУ
Коробов В.П., к.м.н., доцент каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, зав. лаб. биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН
Еремина А.А., к.б.н., помощник директора ИЭГМ УрО РАН
Козлов С.В., к.б.н., ученый секретарь ИЭГМ УрО РАН
Шумков М.С., к.б.н., н.с., председатель СМУ ИЭГМ УрО РАН
Егорова Д.О., к.б.н., н.с., зам. председателя СМУ ИЭГМ УрО РАН
Криворучко А.В., к.б.н., старший преподаватель каф. микробиологии и иммунологии ПГНИУ, н.с. ИЭГМ УрО РАН
Ушаков В.Ю., к.б.н., старший преподаватель каф. физиологии растений и микроорганизмов ПГНИУ
Смарцалов К.Н., главный специалист службы инф. технологий ИЭГМ УрО РАН

Основные научные направления конференции:

- экология и генетика микроорганизмов
- разнообразие микроорганизмов и его сохранение
- экологическая физиология бактерий
- экологическая иммунология
- регуляция иммунитета
- взаимодействие микро- и макроорганизмов – микробная индикация загрязнений
- биология ремедиации окружающей среды
- биотрансформация органических молекул
- технологии микробного синтеза целевых продуктов

Конференция проводится при финансовой поддержке:

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы

МИНИСТЕРСТВО ПРОМЫШЛЕННОСТИ, ИННОВАЦИЙ И НАУКИ ПЕРМСКОГО КРАЯ

АНАЛИТ

helicon КОМПАНИЯ ХЕЛИКОН

ДИА-М www.dia-m.ru

BIO-RAD