

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16 **БИОЛОГИЯ**

Издательство Московского университета

№ 4 • 2013 • ОКТЯБРЬ–ДЕКАБРЬ

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Физиология

- Мальшев А.В., Захаров, А.М., Саркисова К.Ю., Дубынин В.А.* Влияние хронического введения малых доз клебоприда на поведенческие реакции белых крыс 3
- Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Никольская К.А.* Противосвертывающая система у животных, обучающихся на фоне совместного действия слабого постоянного магнитного поля и опиоидного пептида опилонга. 9

Биохимия

- Хапчаев Ш.Ю., Гутор С.С., Каминский И.П., Кремер Е.Э., Кривощёков С.В., Мильто И.В., Першина А.Г., Петрова И.В., Салтыкова И.В., Субботина Н.С., Хворилова К.В.* Концентрация токсинов в эндосомальном компартменте клеток, предобработанных рицином и вискумином 14

Геронтология

- Хохлов А.Н.* Эволюция термина “cellular senescence” и ее влияние на состояние современных цитогеронтологических исследований 18

Экология

- Недосекин А.Г., Хазанова К.П., Братковская Л.Б., Плеханов С.Е.* Влияние пирокатехина на фотосинтетические характеристики культуры водорослей 23
- Северцова Е.А., Никифорова А.И., Агильон Гутиеррес Д.Р.* Спектрохимический и гистохимический анализ тканей головастиков травяной лягушки и серой жабы, развивавшихся в условиях имитации загрязнения свинцом и железом 27
- Холошова А.С.* Биологические методы экологической диагностики как эффективный способ оценки качества природной среды 33
- Соловченко А.Е., Лукьянов А.А., Васильева С.Г., Саванина Я.В., Соловченко О.В., Лобкова Е.С.* Возможности биотехнологической переработки сельскохозяйственных отходов с использованием микроводорослей 38

- Указатель статей, опубликованных в журнале “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” в 2013 году 50*

CONTENTS

Physiology

- Malyshev A.V., Zakharov A.M., Sarkisova K.Yu., Dubynin V.A.* Effects of chronical injections of chlebopride in low doses on behavior of white rats. 3
- Podorolskaya L.V., Serebryakova T.N., Nikolskaya K.A.* Anticoagulating system in learning animals. Influence of combined action of week static magnetic field and opiod peptide opilong. 9

Biochemistry

- Khapchaev Sh.Yu., Gutor S.S., Kamynsky Y.P., Cremer E.E., Kryvostchecov S.V., Mylto I.V., Pershina A.G., Petrova I.V., Saltycova I.V., Subbotina N.S., Kchvorylova K.V.* Toxin concentrations in the endosomal compartment of cells pretreated with ricin and viscumin 14

Gerontology

- Khokhlov A.N.* Evolution of the term “cellular senescence” and impact of this evolution on the current cytoogerontological research. 18

Ecology

- Nedosekin A.G., Khazanova K.P., Bratkovskaya L.B., Plekhanov S.E.* Influence of pyroca-techol on characteristics of photosynthesis in algae culture 23
- Severtsova E.A., Nikiforova A.I., Aguillon Gutierrez D.R.* Metal solids in water cause metal accumulation in tissue through ingestion in two amphibian species 27
- Kholoimova A.S.* Biological methods of ecological diagnostics as the qualitative assessment of the environment pollution 33
- Solovchenko A.E., Lukyanov A.A., Vasilieva S.G., Savanina Ya.V., Solovchenko O.V., Lobakova E.S.* Possibilities of microalgal bioconversion of agricultural waste 38
- Index of papers* published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2013 50

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 615.214.2 +591.51

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ МАЛЫХ ДОЗ КЛЕБОПРИДА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ БЕЛЫХ КРЫС**А.В. Малышев, А.М. Захаров, К.Ю. Саркисова*, В.А. Дубынин**

(кафедра физиологии человека и животных,
лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов;
e-mail: malyshev89@gmail.com)

Изучалось влияние селективного антагониста D2-рецепторов клебоприда на поведение взрослых самцов крыс в тестах “потребление сахарозы”, “открытое поле”, “приподнятый крестообразный лабиринт” и “сложный лабиринт” с пищевым подкреплением. Препарат вводился в малых дозах (0,2 и 0,4 мг/кг) хронически в течение двух недель. Показано, что клебоприд способен воздействовать на эмоционально-мотивационное состояние экспериментальных животных, с одной стороны, вызывая депрессивно-подобные изменения; с другой — оказывая некоторое активирующее влияние на способность к обучению и исследовательские реакции. Разнообразие последствий применения D2-антагониста обусловлено, по-видимому, конкуренцией его пост- и пресинаптических эффектов.

Ключевые слова: дофаминергическая система мозга, клебоприд, поведение, депрессия, обучение.

Клебоприд является селективным антагонистом D2-рецепторов дофамина. В экспериментах на животных он в первую очередь используется как нейрорептик и транквилизатор. Большие количества клебоприда (10 и 20 мг/кг) вызывают катаlepsию и паралич задней части тела у детенышей крыс [1]. В не столь высоких дозах препарат, как и другие нейрорептики, оказывает относительно мягкое действие на ЦНС, затрагивая в основном мотивационно-эмоциональную сферу.

К настоящему времени накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о ключевой роли дофамина, прежде всего D2/D3-рецепторов мозга, в патогенезе депрессивных нарушений у человека и животных [2, 3], а также в опосредовании терапевтического эффекта антидепрессантов, независимо от нейрорхимических механизмов их действия [4]. Для депрессии характерно снижение активности дофаминергической системы в центрах, связанных с подкреплением (прежде всего в *nucleus accumbens*) [5].

В наших предыдущих работах было выявлено, что однократно вводимый клебоприд в дозе 0,2 мг/кг вызывает значимое ослабление материнской мотивации и подавление компонентов родительского поведения самок белых крыс (“материнская депрессия”). Вместе с тем параллельного снижения двигательной и исследовательской активности животных не про-

исходило. Более высокая доза препарата (0,5 мг/кг) не только подавляла материнское поведение, но и уменьшала подвижность кормящих самок [6].

Субхроническое (4–6 дней) введение клебоприда в дозе 0,2 мг/кг вызывает более выраженное, чем однократные инъекции, ослабление родительской заботы (неопубликованные результаты). Имеющаяся в нашем распоряжении информация, а также данные литературы подтверждают представление о важном вкладе D2-рецепторов в развитие поведенческих проявлений послеродовой депрессии.

В представленном исследовании мы анализировали влияние малых доз повторно вводимого клебоприда на поведение взрослых самцов белых крыс в тестах на депрессивность, общую двигательную активность, тревожность и способность к обучению.

Объекты и методы

Работа выполнена на половозрелых самцах крыс линии Wistar (n = 52). Всего было проведено две серии экспериментов. В первой из них животные (n = 25) были разделены на 3 группы: контрольная (плацебо, 9 особей); экспериментальная группа, получавшая инъекции клебоприда в дозе 0,2 мг/кг (8 особей); экспериментальная группа, получавшая инъекции клебоприда в дозе 0,4 мг/кг (8 особей). Возраст животных составлял 3 месяца, средний вес —

* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, лаборатория функциональной биохимии нервной системы, г. Москва.

300 г. У крыс оценивалось потребление сахарозы, а также поведение в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт”. Работа была выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Во второй серии крысы ($n = 27$) были разделены на 2 группы: контрольную (плацебо, 14 особей) и экспериментальную, получавшую инъекции препарата в дозе 0,4 мг/кг (13 особей). Возраст животных составлял 5–6 месяцев, средний вес — 450 г. Крысы обучались в “сложном лабиринте” с пищевым подкреплением. Серия была выполнена на базе Института ВНД и нейрофизиологии РАН.

Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Клебоприд (“Sigma Aldrich”) растворяли в физиологическом растворе; инъекции делали внутривенно инсулиновым шприцем в течение 2 недель немедленно после проведения поведенческого тестирования. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя (1 мл/кг).

Тест на потребление сахарозы используется для оценки одного из основных показателей депрессивности животных — ангедонии [7]. Крысу помещали на 15 мин в экспериментальную камеру, где регистрировали количество выпитой жидкости (20%-й раствор сахарозы). Животных не подвергали специальной процедуре пищевой или питьевой депривации. Тестирование проводили ежедневно в течение 11 дней.

Уровень двигательной активности и исследовательской деятельности крыс оценивали в “открытом поле”, представляющем собой круглую арену с высокими стенками и небольшими отверстиями — “норками” (“Открытая Наука”, Москва). Тест проводили со сменой освещенности по следующему протоколу: первые 3 мин — яркий свет, затем 1 мин — красный свет и 1 мин — яркий свет. В ходе наблюдений по минутно определяли горизонтальную (по количеству пересеченных секторов арены) и вертикальную (по количеству стоек) активность крыс, число выходов в центр арены, а также ряд других параметров [8].

Для определения баланса оборонительной и исследовательской мотиваций животных тестировали в “приподнятом крестообразном лабиринте” (“Открытая Наука”, Москва). В начале опыта крысу помещали в центр лабиринта, после чего ей предоставлялась возможность свободно перемещаться по двум затемненным (со стенками) и двум ярко освещенным (открытым) рукавам. Каждая крыса проводила в установке 5 мин. Регистрировали число стоек, умываний и затаиваний, количество выглядываний из темных рукавов, выходов на свет и ряд других параметров [8].

Обучение животных производили в “сложном лабиринте”, который представляет собой квадратную камеру, разделенную пятью параллельными прозрачными перегородками на 6 равных по ширине отсеков-коридоров. В каждой перегородке имеется пря-

моугольное отверстие [9]. Перед экспериментом животных подвергали 24-часовой пищевой депривации. Затем проводилась адаптация крыс к условиям эксперимента. В последующие 6 дней животное помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно, длительность каждой посадки не превышала 3 мин. В качестве подкрепления использовались стандартные сахарозные шарики (находились в самом удаленном отсеке). Регистрировали количество выполненных реакций (по числу найденных подкреплений), латентный период взятия подкрепления, латентный период выхода из стартового (ближайшего к экспериментатору) отсека и ряд других параметров. В дни опыта животных кормили один раз в сутки непосредственно после эксперимента.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ Statistica V8.0 и MS Office Excel 2003. Вычисляли средние (AM) и ошибки средних (SEM) массивов данных. Статистический анализ реализовывался с использованием параметрических методов (t -критерий Стьюдента для независимых и зависимых выборок), непараметрических методов (критерии Манна—Уитни, χ^2 , Фишера), а также двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA).

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов был проведен тест на потребление сахарозы, направленный на оценку мотивационно-эмоционального состояния животных и выявление такого симптома депрессивных расстройств, как ангедония. Измерение количества потребляемой сахарозы начинали через трое суток после первой инъекции клебоприда, очередная инъекция производилась немедленно после тестирования. Значимые различия в количестве потребляемого раствора сахарозы между контрольной группой и группой, получавшей клебоприд в большей дозе, были зарегистрированы на 3-й день проведения теста, что соответствует 5 инъекциям D2-антагониста. Эти различия проявлялись, кроме того, в 4, 5, 6 и 8-й дни измерений (рис. 1, А). Применение ANOVA-метода показало, что различия в потреблении сахарозы являются достоверными в интервале с 3-го по 10-й день измерений. Также значимыми оказались различия по среднему количеству потребляемой сахарозы за период с 3-го по 10-й день суммарно (рис. 1, Б). В последние дни наблюдений эффекты становились недостоверны, что, по-видимому, связано с постепенным развитием толерантности к действию препарата.

Доза 0,2 мг/кг оказалась неэффективной для формирования депрессивноподобного состояния: ни в один из дней тестирования не зарегистрировано отличий от контрольной группы.

При тестировании животных в “открытом поле” через сутки после 7-й инъекции клебоприда были выявлены некоторые активирующие влияния, только меньшей дозы. Величина горизонтальной двигатель-

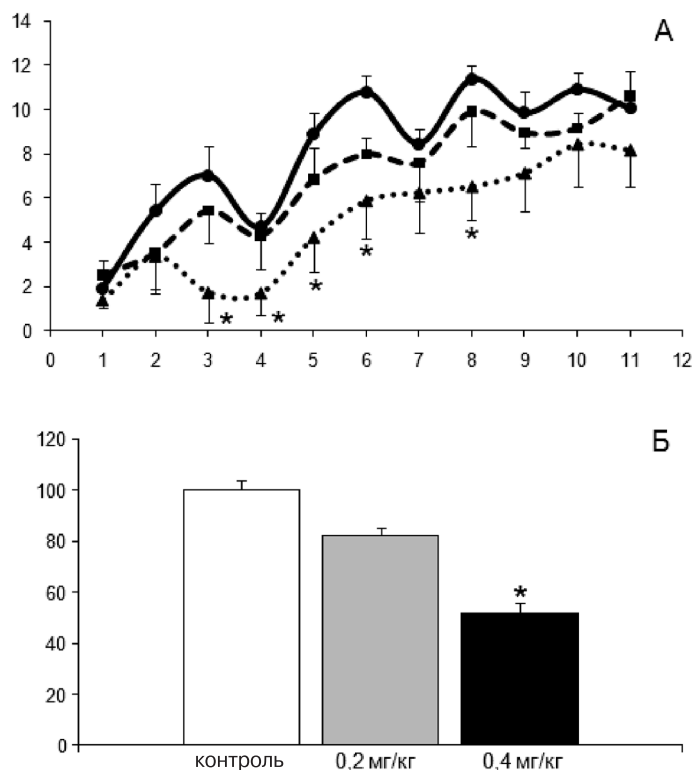


Рис. 1. Влияние клонидина на потребление раствора сахарозы самцами белых крыс.

А. Динамика потребления. По оси ординат — количество сахарозы в граммах ($AM \pm SEM$); по оси абсцисс — дни тестирования. Обозначения: сплошная линия — контрольная группа; прерывистая линия — группа, получавшая клонидин в дозе 0,2 мг/кг; пунктирная линия — группа, получавшая клонидин в дозе 0,4 мг/кг. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены * (по t-критерию Стьюдента).

Б. Среднее количество потребляемого раствора сахарозы в период с 3-го по 10-й день проведения теста. По оси ординат — процент от потребления в контрольной группе. Обозначения: белый цвет — контроль; серый цвет — группа, получавшая клонидин в дозе 0,2 мг/кг; черный цвет — группа, получавшая клонидин в дозе 0,4 мг/кг. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены * (по t-критерию Стьюдента).

ной активности суммарно за 5 мин тестирования в соответствующей группе оказалась достоверно больше по сравнению с контролем (рис. 2, А). Наиболее выраженные отличия зарегистрированы на 1-й (при ярком свете) и 4-й (при красном свете) минутах наблюдений ($p = 0,04$ по критерию Стьюдента). Кроме того, крысы, получавшие инъекции клонидина в дозе 0,2 мг/кг, совершали заметно больше выходов в центр арены: только 1 крыса из опытной группы не сделала ни одного выхода в центр, в то время как в контроле таких животных было 5 ($p = 0,06$ по критерию χ^2 ; рис. 2, Б).

По результатам тестирования в “приподнятом крестообразном лабиринте” для большей дозы препарата зарегистрирован некоторый анксиолитический эффект: снижение времени, проведенного в закрытых рукавах лабиринта, а также увеличение числа свешиваний с открытых лучей. В контрольной группе имелись 4 особи, которые за 5 мин тестирования

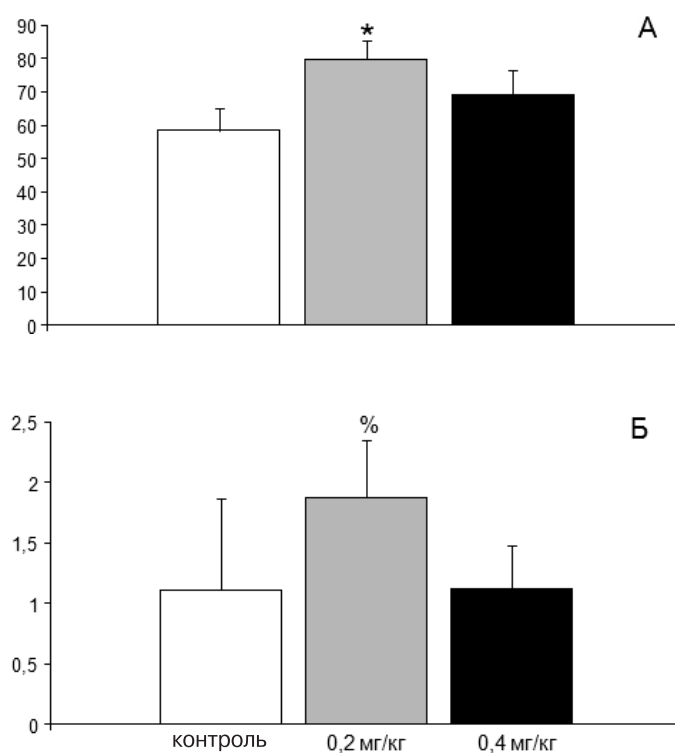


Рис. 2. Влияние клонидина на поведение животных в тесте “открытое поле” со сменой освещенности. По оси ординат — величина параметров.

Показано количество пересеченных секторов арены “открытого поля” (А) и число выходов в центр арены (Б) за 5 мин тестирования. Отличия от контроля с $p = 0,06$ отмечены % (по критерию χ^2). Остальные обозначения, как на рис. 1, Б

провели более 250 сек в закрытых рукавах лабиринта, в то время как в группе, получавшей клонидин в дозе 0,4 мг/кг, таких животных не было ($p = 0,03$ по критерию χ^2 ; рис. 3, А). Также в этой группе все крысы совершили хотя бы одно свешивание с открытых рукавов, тогда как в контроле оказалось 4 особи, которые не выполняли свешиваний ($p = 0,03$ по критерию χ^2 , рис. 3, Б).

Таким образом, в тесте на потребление сахарозы нами зарегистрирован продепрессантный эффект более высокой дозы препарата. В то же время в тестах “открытое поле” и “крестообразный приподнятый лабиринт” мы наблюдали определенное активирующее влияние клонидина, выражающееся в повышении двигательной активности и исследовательской мотивации крыс вместе с параллельным снижением уровня тревожности. Полученные результаты могут быть связаны с различиями в чувствительности отделов мозга к малым дозам антагонистов дофамина (в том числе с разной концентрацией в этих отделах D2-рецепторов в *nucleus accumbens*, стрио-паллидарной системе, гипоталамусе, новой коре). Следует также учитывать не только пост-, но и пресинаптическое действие нейрорептиков (о чем будет сказано ниже).

Представленные данные хорошо соотносятся с влиянием клонидина на параметры материнского поведения самок белых крыс: у животных наблю-

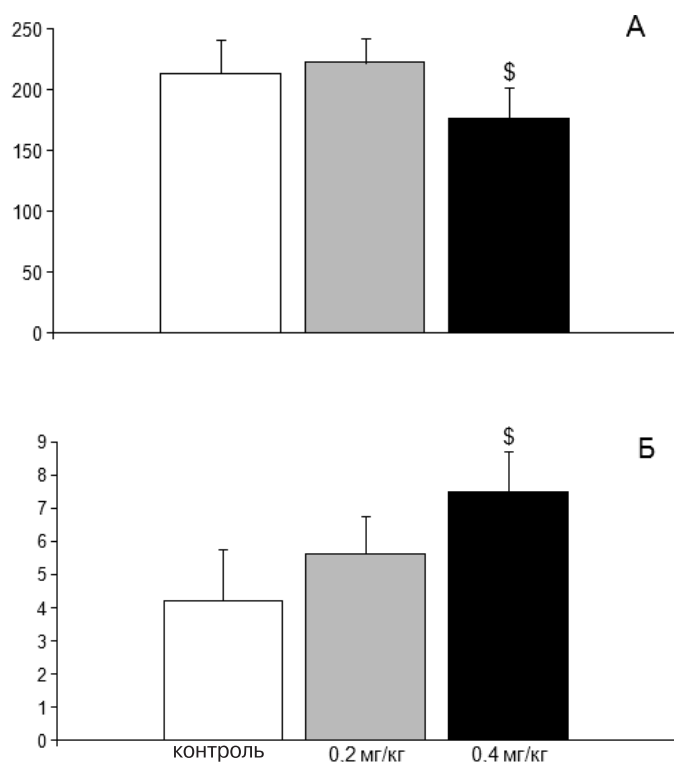


Рис. 3. Влияние клебоприда на поведение животных в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. По оси ординат — величина параметров.

Показано время, проведенное в закрытых рукавах лабиринта (А) и количество свешиваний с открытых рукавов (Б). Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены \$ (по критерию χ^2). Остальные обозначения, как на рис. 1, Б

далось снижение выраженности родительской мотивации (“материнская депрессия”) параллельно с ростом двигательной активности (неопубликованные результаты).

Во второй серии экспериментов было исследовано воздействие клебоприда в дозе 0,4 мг/кг на обучение. Выработка навыка в тесте “сложный лабиринт” с пищевым подкреплением была начата через сутки после 6-й инъекции D2-антагониста. Введение препарата продолжалось и в последующие дни.

Показано, что для взрослых крыс (возраст 5—6 мес) задача выработки пищевого навыка является сложной, и рост числа выполненных реакций происходит очень медленно. В результате к 6-му дню обучения лишь около 60% животных реализовывали условный пищевого рефлекс хотя бы 1 раз из 5 посадок. В предыдущих работах нами обнаружено, что детеныши крыс в возрасте 36—40 дней гораздо легче справляются с той же задачей: уже ко 2-му дню обучения примерно 90% из них реализуют условный пищевого навык не менее 4 раз из 5 посадок [9].

В 1—5-е дни обучения значимые межгрупповые различия отсутствовали. На 6-й день наблюдений выявлено определенное улучшение обучения в экспериментальной группе. Число выполненных реакций в случае животных, получавших клебоприд, составило

почти 150% от величины показателя в контроле (рис. 4, А). При этом 4 крысы экспериментальной группы достигли подкрепления во всех 5 попытках, в то время как в контроле таких животных не было ($p = 0,02$ по критерию χ^2). После введения клебоприда время выполнения реакции на 6-й день обучения оказалось ниже: 5 крыс из экспериментальной группы стабильно решали задачу быстрее, чем за 100 сек; в контрольной группе таких особей не было ($p = 0,01$ по критерию χ^2). Кроме того, в экспериментальной группе был значимо снижен латентный период выхода из стартового отсека (рис. 4, Б).

Таким образом, в последний день обучения нами зарегистрировано положительное влияние клебоприда на процесс выработки пищевого навыка. Напомним, что сходные активирующие эффекты препарата в первой серии экспериментов выявлены в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт”. Из литературы известно подобное парадоксальное действие низких доз нейролептиков. Его механизмы обусловлены пресинаптическими эффектами D2-антагонистов, способных выключать ауторецепторы дофамина. Ауторецепторы, как известно, тормозят выделение дофамина, и результатом их блокады является активация дофаминергических синапсов [10].

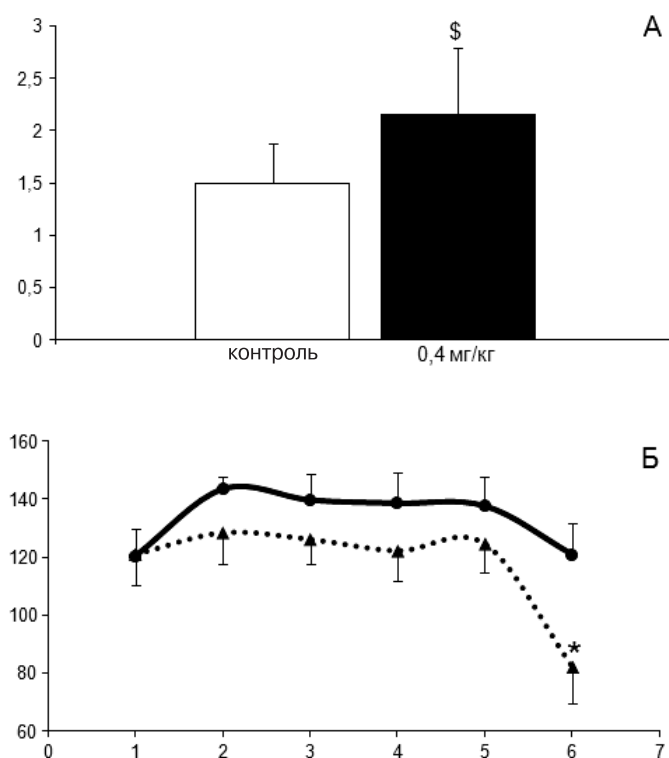


Рис. 4. Влияние клебоприда на обучение крыс в экспериментальной установке “сложный лабиринт” с пищевым подкреплением. А. Количество выполненных реакций на 6-й день тестирования. По вертикали — величина параметра. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены \$ (по критерию χ^2).

Б. Динамика латентного периода выхода из стартового отсека (сек). По оси ординат — сек; по оси абсцисс — дни тестирования. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены * (по t-критерию Стьюдента). Остальные обозначения, как на рис. 1, А

Зарегистрированное нами активирующее действие клебоприда может быть также связано с включением компенсаторных процессов в мозге животных. Известно, что при резкой отмене нейролептиков у пациентов наблюдаются яркие психотические симптомы, что связано с усилением дофаминергической передачи. Хроническое введение нейролептиков (несколько недель) увеличивает синтез дофамина и количество постсинаптических рецепторов к нему [11]. Обратные эффекты вызывают психомоторные стимуляторы: при их длительном введении количество дофамина в мозге снижается [12].

Полученные нами результаты способствуют более глубокому пониманию функций дофамина в процессах обучения и формирования памяти, позволяют объяснить целый ряд парадоксальных эффектов нейролептиков, наблюдаемых в клинической практике. Вместе с тем нами показано, что повторное введение даже низких доз D2-антагониста может вызывать депрессивноподобные симптомы (по крайней мере в тесте на потребление сахарозы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Byrnes E.M., Ughrin Y., Bruno J.P. Developmental plasticity in the D1- and D2-mediation of motor behavior in rats depleted of dopamine as neonates // *Dev. Psychobiol.* 1996. Vol. 29. N 8. P. 653–666.
2. D'Haen H., Bossuyt A. Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography // *Biol. Psych.* 1994. Vol. 35. N 2. P. 128–132.
3. Drago F., Arezzi A., Vitzl A. Effects of acute or chronic administration of substituted benzamides in experimental models of depression in rats // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2000. Vol. 10. N 6. P. 437–442.
4. D'Aquila P.S., Collu M., Gessa G.L., Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. Vol. 405. N 1–3. P. 365–373.
5. Sarkisova K., van Luijckelaar G. The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. Vol. 35 N 4. P. 854–876.
6. Добрякова Ю.В., Дубынин В.А., Ван Луийтелаар Ж. Материнское поведение крыс линии WAG/Rij в норме и при действии на дофаминергическую систему мозга // *Журн. высш. нервн. деят.* 2010. Т. 60. № 3. С. 372–380.
7. Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Шацкова А.Б. Тревожны ли крысы линии WAG/Rij с генетической absence-

Выводы

1. Показано, что хроническое введение клебоприда в дозе 0,4 мг/кг, не снижающей двигательную активность, вызывает падение потребления сахарозы животными, что можно расценить как продепрессантный эффект, проявляющийся в форме ангедонии. Механизм его развития, по всей вероятности, обусловлен снижением интенсивности дофаминергической передачи в мозговых центрах, связанных с подкреплением.

2. Повторное введение клебоприда привело к повышению двигательной и исследовательской активности крыс (доза 0,2 мг/кг); снижению уровня тревожности и некоторому улучшению обучения с пищевым подкреплением (доза 0,4 мг/кг). Вероятно, активирующие эффекты препарата связаны с его пресинаптическим действием, а также с развитием (в ответ на хроническое применение) компенсаторных процессов в мозге животных.

эпилепсией? // *Журн. высш. нервн. деят.* 2005. Т. 55. № 2. С. 241–249.

8. Дубынин В.А., Каменский А.А. Бета-казоморфины и их роль в регуляции поведения. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 306 с.

9. Беляева Ю.А., Дубынин В.А., Стоволосов И.С., Добрякова Ю.В., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Влияние однократного и хронического введения экзорфина С на поведение и обучение детенышей белых крыс // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология.* 2009. № 2. С. 13–18.

10. Benoit-Marand M., Borrelli E., Gonon F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. N 23. P. 9134–9141.

11. Wasti A., Siddiqui N.A. Alterations in the level of neurotransmitters associated with the chronic treatment of antipsychotic drugs // *J. Pak. Med. Assoc.* 2010. Vol. 60. N 8. P. 628–632.

12. Lee J., Parish C.L., Tomas D., Horne K. Chronic cocaine administration reduces striatal dopamine terminal density and striatal dopamine release which leads to drug-seeking behaviour // *Neuroscience.* 2011. Vol. 174. P. 143–150.

Поступила в редакцию
13.09.12

EFFECTS OF CHRONICAL INJECTIONS OF CLEBOPRIDE IN LOW DOSES ON BEHAVIOR REACTIONS OF WHITE RATS

A.V. Malyshev, A.M. Zakharov, K.Yu. Sarkisova, V.A. Dubynin

Effects of the selective D2-receptors antagonist clebopride on behavior of adult males rats was studied in such tests as sucrose consumption, "open field", "elevated plus maze" and "complex maze" with a food reinforcement. The drug was injected in small doses (0,2 and 0,4 mg/kg) chronically within two weeks. It was shown that clebopride may have an influence on emotionally-motivational

state of experimental animals, on the one hand, causing depressive-like changes, and on the other — improve learning ability and research behavior. A variety of consequences of D2-antagonist action is caused, apparently, by a competition of its post- and presynaptic effects.

Key words: *dopamine brain system, clebopride, behavior, depression, learning.*

Сведения об авторах

Мальшев Антон Викторович — аспирант 1-го года обучения биологического факультета МГУ, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов. Тел.: 8-916-51-38-707; e-mail: malyshev89@gmail.com

Захаров Антон Михайлович — студент 5-го курса биологического факультета МГУ, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов. Тел.: 8-916-81-36-100; e-mail: zam1561@yandex.ru

Саркисова Карине Юрьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (ИВНД и НФ РАН). Тел.: 8-903-01-35-750; e-mail: karine@online.ru

Дубынин Вячеслав Альбертович — докт. биол. наук., проф. кафедры физиологии человека и животных, лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-14-48-611; e-mail: dva-msu@yandex.ru

УДК 591.11.3:59151.513:612:821

ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩАЯ СИСТЕМА У ЖИВОТНЫХ, ОБУЧАЮЩИХСЯ НА ФОНЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ СЛАБОГО ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И ОПИОИДНОГО ПЕПТИДА ОПИЛОНГА

Л.В. Подорольская, Т.Н. Серебрякова, К.А. Никольская

(кафедра физиологии человека и животных, кафедра высшей нервной деятельности;
e-mail: tnsrb@mail.ru)

Информационная нагрузка у крыс линии Вистар, обучавшихся решению пищедобывательной задачи в течение 20 сеансов в стандартных экспериментальных условиях, не изменяла функциональное состояние противосвертывающей системы по окончании обучения по сравнению с интактными животными. Обучение в условиях совместного действия слабого магнитного поля и предварительного 5-кратного внутримышечного введения опиоидного пептида опилонга значительно улучшало познавательную активность, но приводило к гиперкоагуляции, дисбалансу фибринолитических процессов, депрессии функции противосвертывающей системы.

Ключевые слова: *противосвертывающая система, гемостаз, фибринолиз, постоянное магнитное поле, опилонг.*

Большой объем информации, воспринимаемый современным человеком, стимулирует поиск путей адекватной ее переработки и анализа, а также способы, помогающие избежать сопутствующие психоэмоциональное напряжение, стрессы, болезни. Изучать эти насущные вопросы можно в том числе в модельных экспериментах, имитирующих познавательную деятельность человека, испытывающего при обучении информационные перегрузки [1]. Используемая в работе пищедобывательная поведенческая модель была разработана для исследования психофизического статуса животного при обучении, но в то же время представляется вполне приемлемым инструментом изучения самых разных физиолого-биохимических процессов и систем в организме, чувствительных к информационным перегрузкам. Одной из них является противосвертывающая система (ПСС), которая, манипулируя активностью протеолитических процессов гемостаза и фибринолиза, контролирует жидкое состояние крови в кровеносных сосудах, обеспечивает защиту от тромбоза, в то же время очень восприимчива к информационному и интеллектуальному стрессу [2, 3]. С помощью этой модели были изучены психостимуляторы (факторы, повышающие познавательную активность) фармакологические (ноотроп пирацетам, опиоидный пептид опилонг [4]) и физические — слабое магнитное поле [5]. Были показаны, с одной стороны, их улучшающие познавательную деятельность свойства, с другой — существенное влияние на состояние гемостаза и фибринолиза вплоть до развития предтромботического состояния. В то же время в реальной жизни трудно

представить изолированное действие какого-либо из перечисленных факторов, и интеллектуальная деятельность современного обучающегося человека осуществляется с одновременным воздействием по крайней мере двух из них: постоянное магнитное поле (ПМП) создается как техногенно — приборами, аппаратами, мобильными телефонами, проводами и др., так и естественно — геомагнитными бурями, а стимулирующие препараты типа опилонга применяются для улучшения восприятия и анализа информации [6]. Целью работы было изучение совместного действия этих психостимуляторов — фармакологического (опилонга) и физического (ПМП) — на состояние противосвертывающей системы (ПСС) в процессе обучения.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар с исходным весом 200—220 г. В качестве информационной нагрузки животным предлагали самостоятельно решить пищедобывательную проблемную задачу в многоальтернативном лабиринте, подробно описанную в ряде публикаций [1, 7]. Обучение проводили ежедневно в течение 20 сеансов на естественном магнитном фоне (37 ± 2 мкТл) и на фоне слабых искажений внешнего магнитного поля (МП), создававшихся тремя постоянными магнитами (ПМП), взятых от бытовых радиоприемников, расположенных на расстоянии 5 см от пола экспериментальной камеры, находящейся на столе, которые усиливали внешнее МП до 75—200 мкТл для вертикальной компоненты и 35—200 мкТл для горизонтальной.

При этом вертикальная компонента была инвертирована относительно естественного направления силовых линий в точках, отстоящих на 1 м от зоны эксперимента. Докармливание животных после опыта проводили уже на фоне естественного МП в течение 45 мин. Измерения делали с помощью магнетометра ТМ75-41 (ИЗМИРАН). В качестве опиоида был использован опилонг — синтетический аналог дерморфина (Н-Тур-d-Ala-Phe-d-Ala-Тур-Pro-Ser- NH-CH₃), синтезированный в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ РАМН. Опилонг (Оп) вводили опытной группе внутримышечно в дозе 50 мкг/кг в течение 5 дней до начала обучения, а в группе активного контроля использовали физиологический раствор. Уровень пищевой депривации составлял 24 ч, длительность опыта — 13 мин. Использовались три группы крыс: интактные (контроль), крысы, подвергавшиеся информационной нагрузке без дополнительных воздействий (просто обучавшиеся) и опытная группа, обучавшаяся на фоне Оп + ПМП (ПМП + Оп индуцированные крысы).

Кровь для исследований брали до начала опыта и через месяц, сразу по окончании процесса обучения. В крови определяли параметры гемостаза и фибринолиза: содержание фибриногена (г/л), время рекальцификации плазмы (с), неферментативную фибринолитическую активность (мм²), время лизиса эуглобулиновой фракции плазмы (ВЛЭФ, мин), фибринолитическую активность (ФА) на стандартных фибриновых пластинах — суммарная фибринолитическая активность (СФА, мм²), активность акти-

ватора плазминогена (мм²), активность ингибитора активатора плазминогена (ПАИ-1, %). Все методы, реактивы и оборудование описаны в методическом пособии [8].

Статистическая обработка полученных результатов и оценка различий распределения проводилась с использованием критериев Колмогорова—Смирнова и t-Стюдента. Если выборка имела распределение, отличное от нормального, применяли непараметрические методы — W-test Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что совместное действие опилонга и магнитного фактора оказало весьма заметное психостимулирующее воздействие. В отличие от просто обучавшейся группы, имеющей результат 40% после обучения, все ПМП + Оп-индуцированные крысы (100%) смогли успешно решить предложенную задачу, проявляя целенаправленное пищедобывательное поведение. Однако в опытной группе значительно усилились стрессуемость и невротические проявления.

Состояние ПСС было различным в зависимости от условий обучения. При обучении без дополнительных внешних воздействий значения почти всех определяемых параметров ПСС были очень близки к таковым для интактных животных (таблица). Исключение составил показатель ВЛЭФ, демонстрирующий торможение фибринолиза примерно на 20% после обучения (рис. 1). Поскольку показатель ВЛЭФ

Параметры гемостаза и фибринолиза у крыс, обучавшихся на фоне совместного действия ПМП и опилонга

			Интактные	Обучение	МП + Опилонг
Гемостаз	Фибриноген, г/л	среднее (M ± m)	4,3 ± 0,008	4,0 ± 0,02	4,1 ± 0,2
		мода	4,4	3,9	4,5
		min—max	1,4—8,6	1,3—8,9	2,2—6,1*
	Рекальцификация, с	среднее	90,6 ± 1,5	96,7 ± 2,8	80,9 ± 1,4**^
		мода	93,1	92,8	90,4
		min—max	40—400	45—200*	60—90***^^
	Неферментативный фибринолиз, мм²	среднее	24,0 ± 1,3	21,0 ± 1,9	16,4 ± 2,0*
		мода	8,3	9,5	32***^^
		min—max	0—170	0—132	0—50***^^
Фибринолиз	Суммарная фибринолитическая активность, мм²	среднее	52,9 ± 2,7	51,0 ± 3,0	66,7 ± 2,3***^^
		мода	15,6	31,3**	86,7***^^
		min—max	1—260	1—154*	25—90***^^
	Активатор плазминогена, мм²	среднее	23,8 ± 1,5	22,6 ± 2,3	45,8 ± 2,8***^^
		мода	9,3	10,1	44***^^
		min—max	0—89	0—125	16—60*^
n =			50	50	50

Примечание. * и ** — 0,05 и 0,01 — достоверные значения МП + опилонг животных в сравнении с интактной группой, ^ — 0,05 и ^^ — 0,01 и обучавшейся группой (t-Student).

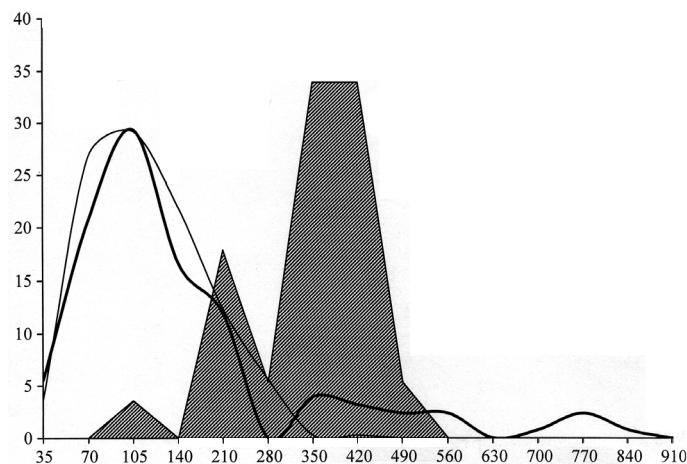


Рис. 1. Характер распределения параметра время лизиса эуглобулиновой фракции в популяции крыс Вистар в зависимости от фактора воздействия.

По горизонтали — минуты, по вертикали — процент животных с соответствующим временем лизиса; тонкая линия — интактная группа, толстая — животные, подвергнутые действию информационной нагрузки, заштрихованная площадь — группа, обучавшаяся на фоне совместного действия ПМП и опилонга

часто используется в клинических и экспериментальных исследованиях как наиболее интегральный и информативный, то следует подробнее остановиться на его особенностях в нашем эксперименте. Из рис. 1, показывающего распределение величин параметра ВЛЭФ в группах животных, видно, что для абсолютного большинства (93,82% интактных и 84,2% просто обучавшихся крыс) разницы в ФА практически нет: кривые очень близки в области наиболее типичных в популяции величин ВЛЭФ — 35—210 мин. Однако сверхвысокие значения ВЛЭФ (очень низкая ФА — более 280 мин) все же имеют 6,18% интактных крыс, число которых при обучении возрастает до 16%. Это означает, что тормозящий ФА эффект обучения распространяется преимущественно на животных с запредельно низким уровнем фибринолиза, встречающегося в популяции довольно редко (6,18%). Ранее мы предположили, что именно эти животные наиболее чувствительны к различным повреждениям, являясь основной мишенью различных патологических воздействий, например алкоголя [7, 9]. Другое объяснение может быть связано с особенностями определения этого параметра. Действительно, показатель ВЛЭФ отличается сложной многокомпонентной структурой, в составе которой могут присутствовать малоизученные элементы, например свободные радикалы, формирующиеся при стрессе [10] и влияющие на структуру фибриногена [11], состав, свойства и концентрация которого в значительной мере определяет величину ВЛЭФ. Таким образом, достоверное торможение фибринолиза по параметру ВЛЭФ после обучения представляет либо артефакт определения, либо, если это так на самом деле, касается очень небольшой группы интактных крыс. Другие используемые нами мето-

ды определения ФА демонстрировали значения, как видно из таблицы, очень близкие у животных интактных и обучающихся (СФА, активность активатора пламиногена), свидетельствуя об отсутствии влияния самого фактора обучения на ФА. Не менялась в процессе обучения и активность главного ингибитора фибринолиза — ПАИ-1, как это видно из кривых распределения этого показателя на рис. 2.

Итак, процесс обучения интактных крыс не вызывал значительных изменений параметров гемостаза и фибринолиза у подавляющего большинства животных. Не менялась в том числе и “норма реакции” (min—max), и модальных (наиболее встречающихся в популяции) величин параметров, показывая (таблица), что одна информационная нагрузка без дополнительных внешних или внутренних факторов не влияет на популяционные характеристики групп, их стабильность, пластичность, адекватность к воздействиям. Некоторая тенденция в направлении гипофибринолиза по параметру ВЛЭФ достаточно компенсировалась антикоагулянтной направленностью, выраженной уменьшением уровня фибриногена и удлинением времени рекальцификации, а также увеличением модальных значений суммарной фибринолитической активности (таблица).

Обучение в условиях совместного действия слабого ПМП и опилонга имитирует современную ситуацию деятельности человека, окруженного магнитосодержащими приборами и принимающего психотропные препараты. Оказалось, что комбинация ПМП и опилонга существенно активировала как протеазы гемостаза и фибринолиза, так и их ингибиторы (таблица, рис. 1, 2). Активацию гемостаза по параметру времени рекальцификации (на 28%) за-

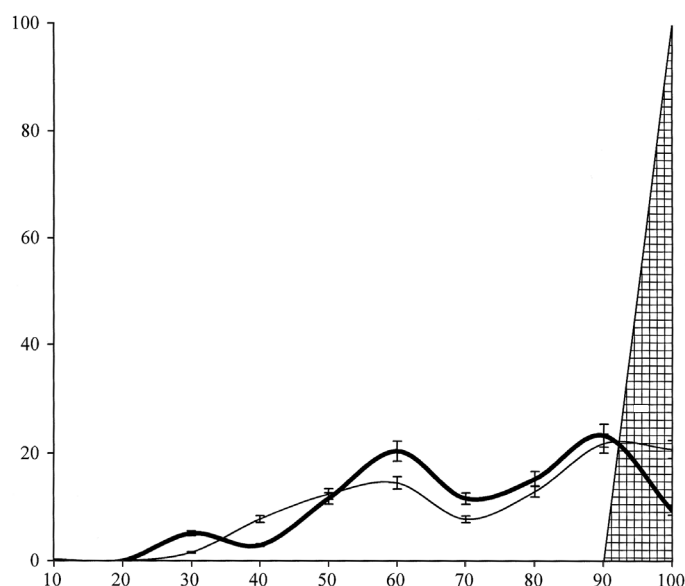


Рис. 2. Характер распределения параметра активности ингибитора активатора пламиногена в популяции крыс Вистар в зависимости от фактора воздействия.

По горизонтали — процент, по вертикали — процент животных; остальные обозначения, как на рис. 1

метно поддерживал показатель неферментативного фибринолиза — основной защитный противотромботический компонент ПСС, который реагировал падением активности у большинства животных (мода) и сужением “нормы реакции”, обуславливающей смещение среднего значения в область более низких величин. Существенный дисбаланс наблюдался среди фибринолитических параметров. ФА, определяемая на фибриновом субстрате (активность активатора плазминогена и СФА), увеличивалась соответственно на 86% и 33% у ПМП + Оп-индуцированных крыс по сравнению с просто обучающимися животными. Однако ВЛЭФ — наиболее интегральный показатель фибринолиза — показывал удлинение в 2 раза, свидетельствуя о мощном торможении ФА (рис. 1). Из рис. 1 видно, что теперь 79% животных составляли группу с сильно заторможенной ФА по сравнению с 16% в контроле (среднее значение ВЛЭФ в этой группе достоверно возросло до $305 \pm 12,6$ мин по сравнению с $159,5 \pm 20,7$ мин в группе с обучением и $125 \pm 12,6$ мин у интактных крыс). О торможении ФА свидетельствовало и значительное увеличение активности ингибитора фибринолиза ПАИ-1, при этом на рис. 2 видно, как все опытные животные приобрели активность 100% по сравнению с 72,3% в двух контрольных группах. Именно ПАИ-1 — основной ингибитор активности активаторов фибринолиза — в последние годы признается одним из главных маркеров предтромботического состояния [12], поэтому ингибирование фибринолиза по двум наиболее весомым параметрам (ВЛЭФ и ПАИ-1) свидетельствовало о реальной ситуации депрессии противосвертывающих механизмов в случае добавления к процессу обучения магнитного поля и опилонга.

Ранее мы показали, что аналогичный сдвиг происходит при действии только одного опилонга [4]. Однако если препарат тормозил фибринолиз по всем параметрам, то совместное применение двух факторов стимулирует ФА, связанную с эндотелием (активность активатора плазминогена, СФА), — эффект, присущий ПМП [5], хотя и не реализуемый в отношении лизиса собственного фибрина (параметр ВЛЭФ). Скачок активности ПАИ-1 еще более усиливал антифибринолитический потенциал крови. В этой ситуации можно говорить о депрессии функции ПСС. В таблице показано, что в отличие от изолированной информационной нагрузки обучение в присутствии ПМП и опилонга сужало норму реакции, что считается негативным явлением, говорит о потере популяционного многообразия, пластичности, адекватности реагирования и т.д. Сравнивая изменения параметров при изолированном действии изучаемых факторов, описанные нами ранее, и при их совместном применении, можно заключить, что в последнем случае имеются особенности, присущие и опилонгу, и ПМП, хотя нет как полной идентичности, так и эффектов потенциации или нивелирования.

Таким образом, проведенные исследования показали, что только одна информационная нагрузка в процессе познавательной деятельности при обучении, основанная на пищедобывательном безусловном рефлексе, развивающаяся в течение 20 сеансов ежедневных тренировок у крыс, вызывая повышенную стрессируемость и невротизацию, практически не влияет на состояние ПСС. Это подтверждает ее (ПСС) большой резервный потенциал в здоровом организме. Обучение, несомненно, представляет важнейший биологический феномен в жизни популяции, необходимый для сохранения вида. Возможно, информация, получаемая в результате обучения поиска пищи, являясь естественным экологическим фактором, стимулирует в эволюции мощные защитные механизмы, в том числе противотромботические. Однако провокационные факторы (физический и фармакологический) независимо от природы и механизма воздействия, будучи чужеродными для жизни популяции, согласно полученным данным, являются мощными стрессорными раздражителями как для психофизического, так и для физиолого-биохимического состояния организма. Действительно, функция ПСС значительно подавлялась в результате действия опилонга [4], добавление магнита резко блокировало фибринолиз, при том что стимулировались другие защитные факторы ПСС — выброс тканевого активатора плазминогена. Наименее опасным и вполне благоприятным в плане функции ПСС оказалось применение одного ПМП, хотя и здесь были возможны гиперкоагуляционные сдвиги, компенсированные, однако, актом ферментативного и неферментативного фибринолиза [5]. Эти данные получены у нормальных интактных крыс с полноценно функционирующей ПСС. В случае же нарушения ее функции, а таких ситуаций много (возраст, инфекции, травмы, болезни, беременность, нездоровый образ жизни и др.), опасность предтромбоза делается реальной, особенно, как мы показали, в случае применения опилонга [4] либо опилонга совместно с ПМП, в меньшей степени одного ПМП [5].

Выводы

1. Совместное действие постоянного магнитного поля и опиоидного пептида опилонга стимулировало процесс обучения решения проблемной пищедобывательной задачи у крыс линии Вистар в 2,5 раза.

2. Одна информационная нагрузка в процессе 20 сеансов обучения решения пищедобывательной задачи у крыс не вызывала изменений состояния противосвертывающей системы по большинству параметров по окончании обучения по сравнению с фоновой активностью.

3. Информационная нагрузка на фоне совместного действия постоянного магнитного поля и предварительного внутримышечного введения опиоидного пептида опилонга активировала гемостаз, тормозила фибринолиз, являясь фактором развития тромбоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никольская К.А. Системно-информационный подход к изучению познавательной деятельности животных // Большой практикум по высшей нервной деятельности и нейрофизиологии / Под ред. Д.В. Евтихина, Б.В. Чернышова. М.: Линор, 2009. С. 5—31.
2. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 827 с.
3. von Känel J.M., Mills P.G., Fainman C., Dimsade J.E. Effect of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: a biobehavioral pathway to coronary artery disease? // *Psychosom. Med.* 2001. Vol. 63. N 4. P. 531—544.
4. Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Никольская К.А. Реакция гемостаза и фибринолиза у крыс при сочетанном действии информационной нагрузки и опиоидного пептида опилонга // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2012. Т. 154. № 7. С. 18—21.
5. Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Андреев Г.В., Никольская К.А., Ковалева В.Н. Свертывающая и противосвертывающая система крыс в условиях повышенной информационной нагрузки и воздействия слабого магнитного поля // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология.* 2003. № 1. С. 6—11.
6. Peart J.N., Gross E.R., Gross G.J. Opioids induced pre-conditionary: recent advances and future perspectives // *Vascular pharmacol.* 2005. Vol. 42. P. 211—218.
7. Никольская К.А., Хонычева Н.М. Особенности обучения крыс в условиях свободного выбора // *Журн. высш. нервн. деят.* 1999. Т. 49. № 3. С. 436—445.
8. Методы исследования фибринолитической активности крови / Под ред. Г.В. Андреев. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981.
9. Cui C., Norinha A., Moricawa H., Alvarez V.A., Stuber G.D., Szumblinski V.K., Kash T.L., Roberto M., Wilcox M.V. New insight on neurobiological mechanisms underlying alcohol addiction // *Neuropharmacology.* 2012. Vol. 67. N 13. P. 223—232.
10. Киричук В.Ф., Цымбал А.А., Антонова О.Н., Тужижкин В.Д., Майбородин А.В., Креницкий А.Н., Бецкий О.В. Система гемостаза в условиях хронического стресса и терапевтическая терапия // *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2006. Т. 26. № 2. С. 35—42.
11. Литвинова М.М., Азизова О.А., Щегловитова О.П., Полосухина Е.Р., Романов Ю.А., Асейчев А.В., Митронченков Е.В. Окисленные формы фибриногена индуцируют экспрессию молекул клеточной адгезии клетками культуры эндотелия кровеносных сосудов головы // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2006. № 4. С. 268—272.
12. Добровольский А.Б., Тимаева Е.В. Система фибринолиза: регуляция активности и физиологические функции ее основных компонентов (обзор) // *Биохимия.* 2002. Т. 67. № 1. С. 116—126.

Поступила в редакцию
10.04.13

ANTICOAGULATING SYSTEM IN LEARNING ANIMALS. INFLUENCE OF COMBINED ACTION OF WEEK STATIC MAGNETIC FIELD AND OPIOID PEPTIDE OPILONG

L.V. Podorolskaya, T.N. Serebryakova, K.A. Nikolskaya

Functional state of anticoagulating system in Wistar rats, learned to solve food seeking problem task during 20 seances in standard experimental conditions did not changed compared to intact animals. Combined action of week static magnetic field and opioid peptide opilong, added to learning process, stimulated it significantly, but resulted in hypercoagulation, fibrinolysis disbalance and depression of anticoagulating system function.

Key words: *anticoagulating system, haemostasis, fibrinolysis, static magnetic field, opilong.*

Сведения об авторах

Подорольская Лидия Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: tnserb@mail.ru

Серебрякова Тамара Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории защитных систем крови биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: tnserb@mail.ru

Никольская Кира Алексеевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-86; e-mail: nikolskaya.kira@yandex.mail.ru

БИОХИМИЯ

УДК 576.32/.36

**КОНЦЕНТРАЦИЯ ТОКСИНОВ
В ЭНДОСОМАЛЬНОМ КОМПАРТМЕНТЕ КЛЕТОК,
ПРЕДОБРАБОТАННЫХ РИЦИНОМ И ВИСКУМИНОМ**

Ш.Ю. Хапчаев, С.С. Гутор*, И.П. Каминский*, Е.Э. Кремер*,
С.В. Кривощёков*, И.В. Мильто*, А.Г. Першина*, И.В. Петрова*,
И.В. Салтыкова*, Н.С. Субботина*, К.В. Хворилова*

(кафедра иммунологии; e-mail: shamikosha@mail.ru)

Получены данные об объеме внутриклеточного компартмента, в котором находится интернализированный токсин, и концентрации токсина в нем. Сделаны предположения о роли агрегатов из молекул токсинов в транслокации А-цепи в цитозоль, приводящей к гибели клеток.

Ключевые слова: *рицин, вискумин, конфокальная микроскопия, моноклональные антитела.*

Растительные токсины рицин (R60) и вискумин (MLI) имеют сходное строение и состоят из двух субъединиц, одна из которых обладает лектиновой активностью и играет ключевую роль в связывании токсина с клеткой, а вторая обладает токсической активностью. Большая часть интернализированного токсина через ранние эндосомы возвращается к клеточной поверхности [1]. Минорная же часть интернализовавшихся молекул через аппарат Гольджи (АГ) транспортируется в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и далее попадает в цитозоль, где инактивирует рибосомы [2]. Показана необходимость разделения субъединиц токсинов для транслокации в цитозоль [3]. Наличие рицина в раннеэндосомальном компартменте позволяет предположить, что там же может происходить и восстановление дисульфидной связи, приводящее к транслокации свободной А-субъединицы в цитоплазму. Самопроизвольное восстановление возможно только при высокой концентрации токсина в данном компартменте. Для вычисления концентрации необходимо знать объем, который занимает известное количество токсина. В данной работе мы посчитали объем компартмента, в котором детектируются молекулы токсинов. Анализ компартментов, в которых выявляются молекулы токсинов, может внести существенные изменения в современные представления о транспорте токсинов и может быть использован при синтезе иммунотоксинов.

Материалы и методы**Токсины**

Рицин (R60) выделяли из семян клещевины (*Ricinus communis*), а вискумин (MLI) — из листьев

омелы белой (*Viscum album*). Токсины очищали в соответствии с описанной методикой [4, 5].

**Получение моноклональных
антител против рицина**

Мышей линии Balb/c (НИИ биомоделей РАМН, Россия) иммунизировали RTA и R60 по различным схемам [6]. Титр антител в сыворотках контролировали при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). Слияние спленоцитов с миеломой линии sp2/0 проводили на третий день после бустерной иммунизации. Миелому выращивали на среде RPMI 1640 (Sigma, США), первичные гибридомы — на среде NAT (Sigma, США). Супернатанты скринировали при помощи ТИФА с биотинилированными R60, RTA и RTB в растворе. Отобранные гибридомы многократно клонировали методом лимитирующих разведений. Моноклональные антитела накапливали в асцитной жидкости и выделяли методом аффинной хроматографии на протеин А-сепарозе (Pharmacia, Sweden).

Получение флуоресцентных конъюгатов

Очищенные токсины конъюгировали с флуорохромами для их визуализации методами конфокальной микроскопии. Для этого сухой флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) разводили в ДМСО до концентрации 100 мг/мл. Белки переводили в карбонатный буфер (pH 9,0), содержащий 1 М NaHCO₃, 20 mM лактозу, и концентрировали до содержания 2 мг/мл. Затем смешивали растворы белка в карбонатном буфере и ФИТЦ в ДМСО так, чтобы избыток ФИТЦ составлял для рицина 25-кратный молярный избы-

* ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

ток, для вискумина — 20-кратный молярный избыток. Инкубировали с перемешиванием 24 ч при комнатной температуре. С помощью гель-фильтрации на колонке PD10 с сорбентом Sephadex G25 очищали пробы от несвязавшегося с белком ФИТЦ. Переводили белок в ФСБ (рН 7,4). Количество групп ФИТЦ, внесенных в одну молекулу белка, было оценено по следующей формуле: $\text{Моль ФИТЦ} / \text{Моль белка} = 2,87 \cdot \text{ОП495} / [\text{ОП280} - \text{ОП495} \cdot 0,35]$, где ОП — оптическая плотность при соответствующей длине волны. Соотношение количества красителя к количеству белка составило для рибина — 4,2; для вискумина — 3,3.

Биотинилирование белков

Белки конъюгировали с биотинамид-N-гидросукцинимидным эфиром в соответствии с рекомендациями производителя (Sigma, США). Биотинамид-N-гидросукцинимидный эфир растворяли в ДМСО (10 мг/мл) и добавляли к моноклональным антителам, растворенным в ФСБ. Инкубировали в течение 1 ч при +37°C и в течение 15 ч при +4°C. Концентрация белков составляла не менее 0,3 мг/мл, молярное соотношение белок/биотин — 1/20. Реакцию останавливали 0,01% NaN_3 . От несвязавшегося с белком биотинамид-N-гидросукцинимидного эфира избавлялись с помощью гель-фильтрации на Sephadex G25. Белок элюировали с колонки ФСБ. Качество биотинилирования оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Определение концентрации R60 в лизатах клеток, преобработанных R60

Клетки линий С6 и 3Т3 выращивали на чашках Петри 3 сут, после чего добавляли 1 мкг/мл R60 и инкубировали при 37°C и 6% CO_2 в течение различных временных интервалов. Затем клетки отмывали от несвязавшегося токсина холодным раствором лактозы и механически снимали с пластика. Полученную взвесь центрифугировали (7 мин, 1500 об/мин). Супернатанты отбирали в новые пробирки, а осадок ресуспендировали в 350 мкл лизирующего раствора (0,1 М NaCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1% Triton X-100 и 1 мМ PMSF, рН 7,4), инкубировали при 4°C 20 мин и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин [7].

Тест-систему 1RK2/2RK1bi [6, 8] использовали для определения концентрации R60. В качестве контроля использовали лизаты клеток соответствующих линий, не обработанных токсинами. При построении калибровочных кривых использовали данные для R60, разведенного на среде культивирования соответствующих линий клеток.

Получение и дальнейший анализ изображений

Изображения были получены на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (Axiovert 200M

510 Meta, Zeiss, Германия). Серии оптических срезов получали либо с одного из каналов, либо синхронно с двух. Установку размеров pinhole для получения изображений с высоким разрешением проводили согласно рекомендациям производителей системы. Дальнейшую обработку выполняли с помощью программного обеспечения. Для получения изображений использовали объективы Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil Dic, Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil Dic и Plan-Apochromat 100x/1,4 Oil. Настройки лазеров и анализирующих фильтров, рекомендованные производителем, подбирались индивидуально для каждого красителя. Диаметр пинхола (pinhole) — 1 диск Эйри (Airy unit), дающий оптимальное соотношение сигнала к шуму. Анализ проводили, используя программное обеспечение Zeiss LSM 510Meta Software release 3.2, ImageJ 1.39q, AutoQuant 9.3 и Adobe Photoshop CS2.

Результаты

Активность каталитической субъединицы РИБ2 очень высока, поэтому для гибели клетки может быть достаточно одной молекулы токсина, попавшего в цитозоль [9]. Столь малое содержание токсина, необходимое для остановки синтеза белка, приводит к еще одному результату: в момент остановки белкового синтеза большая часть внутриклеточного токсина все еще находится в ранних эндосомах [10]. На фоне этого количества токсина, непосредственно не участвующего в дегликозилировании рибосом, выявить фракцию, вовлеченную в остановку синтеза белка, чрезвычайно тяжело.

В то же время исследование этой минорной фракции важно для выявления как клеточных компартментов, в которых восстанавливается дисульфидная связь, так и молекулярных механизмов, задействованных в ее восстановлении. Определение места, где происходит высвобождение свободной А-субъединицы, позволит показать компартменты, из которых происходит ее транслокация в цитозоль, и определить внутриклеточные пути транспорта токсинов, приводящие к гибели клеток.

Анализ объема везикул, содержащих рибин

Для определения объема везикул, содержащих рибин, были получены наборы оптических срезов. Клетки инкубировали с токсином, конъюгированным с ФИТЦ, и анализировали на конфокальном микроскопе, после чего создавали трехмерную реконструкцию.

Анализ общего объема везикул не может быть выполнен микроскопическими методами. Ограничения, налагаемые оптическим разрешением прибора, позволяют установить только объем, больше которого объект быть не может, при этом минимальные размеры могут сильно варьироваться. Этот факт объясняется тем, что объекты, реальные размеры которых

меньше разрешения прибора, будут регистрироваться оптической системой как равные разрешению.

Более точная картина создается при программной обработке полученных изображений, называемой деконволюцией [11]. Общий принцип деконволюции — математический анализ функции распределения точки, позволяющий добиться более четких изображений и частично исправить ошибки, возникающие при получении изображений. Таким образом деконволюция дает более корректные размеры анализируемого объекта. При этом данный метод не дает возможности корректировать все погрешности изображения, хотя и приводит к более точным результатам.

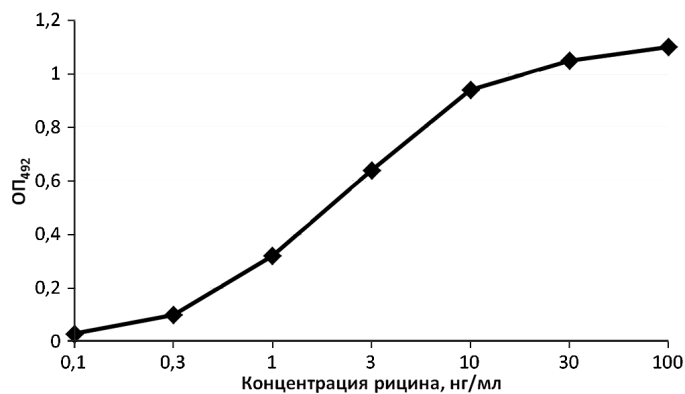
Изображения для анализа были получены с разрешением, при котором реальные размеры пикселя составляют 60 нм. Расстояние между двумя соседними оптическими слоями составило 100 нм. Данные цифры подобраны специально, чтобы размеры полученных вокселей (псевдообъемных единиц изображения) были меньше разрешения оптического микроскопа. Такое избыточное разрешение необходимо для корректного анализа при деконволюции.

Необработанные данные имели реальное разрешение около 220 нм, однако апертура использованного объектива (1,4) после деконволюции позволяет получить виртуальное разрешение ≈ 140 нм. После обработки в программе AutoQuant 9.3 был проанализирован общий объем флуоресцирующих везикул.

Анализируемый объем после деконволюции составляет 215 ± 40 мкм³, что почти в 3 раза меньше, чем объем везикул, полученный с необработанных изображений. Объем компартмента с исходных изображений составил 540 ± 120 мкм³.

Количество рицина в клетках после обработки рицином

Для определения количества рицина в клетках использовали тест-систему на основе моноклональных антител 1RK2/2RK1-bi. Данная тест-система позволяет детектировать концентрацию рицина менее 1 нг/мл (рисунок). Клетки инкубировали с токсинами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, как описано в методах. Через час инкубации среду культивирования забирали и определяли количество несвязавшегося в ней токсина, а клетки фиксировали для дальнейшего микроскопирования.



Концентрация рицина в клетках линий С6 и 3Т3 после 1 ч инкубации 1 мкг/мл

Количество токсина внутри клеток определяли как разницу между исходным количеством рицина и количеством в среде инкубирования.

Результаты, полученные в ТИФА, позволили определить среднее количество белка в клетке. Для этого общий объем флуоресцирующих везикул в одной клетке был разделен на среднее количество белка в пересчете на 1 клетку, полученное в ТИФА. Показано, что средняя концентрация токсина в везикулярном компартменте, содержащем токсин, составляет не менее $1,31 \cdot 10^{-7}$ М после деконволюции и не менее $5,25 \cdot 10^{-8}$ М в случае необработанных данных.

Для анализа вискумина использовали тест-систему на основе моноклональных антител MNA4 и MNA9, описанную ранее [12]. Результаты для вискумина оказались аналогичными результатам для рицина. Концентрация MLI в клеточном компартменте составляет примерно 10^{-7} М (данные не представлены).

Столь высокая концентрация токсинов в данном компартменте позволяет предположить возможность самопроизвольного восстановления дисульфидной связи в некоторых молекулах токсинов, а так же возможность приводить к образованию агрегатов, способных нарушить целостность мембраны, что в свою очередь может привести к транслокации А-субъединицы в цитозоль и вызвать остановку синтеза белка. Знание точных механизмов и путей транспорта РИБ2 может быть использовано при создании оптимального иммунотоксина, который можно будет использовать в терапии опухолевых заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., Kozlovskaya N., Agapov I., Volkmandt W., Bereiter-Hahn J. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments // *Histochem. Cell Biol.* 2004. Vol. 121. P. 429—439.
2. Wesche J., Rapak A., Olsnes S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 34443—34449.
3. Венедиктова О.А., Попова Е.Н., Егорова С.Г., Демина И.А., Мойсенович М.М. Выявление свободной А-цепи рицина в супернатантах клеток, предобработанных нативным токсином // *Биотехнология*. 2005. Т. 6. С. 83—89.
4. Tonevitsky A., Agapov I., Chelnokova O., Moisenovich M., Marx U. Comparison between the mechanisms of action of plant toxins ricin and viscumin on the stage of intracellular dissociation // *Arzneimittelforschung. Drug Research*. 2002. Vol. 52. P. 500—505.

5. Franz H., Ziska P., Kindt A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.) // Biochem. J. 1981. Vol. 195. P. 481–484.

6. Попова Е.Н., Ханчаев Ш.Ю., Егорова С.Г., Демина И.А., Венедиктова О.А., Агапов И.И., Мойсенович М.М. Мышинные моноклональные антитела против рицина не реагируют с агглютинином рицина // Рос. иммунол. журн. 2007. Т. 1(10). № 3–4. С. 59–65.

7. Iversen T.G., Skretting G., Llorente A., Nicoziani P., van Deurs B., Sandvig K. Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases // Mol. Biol. Cell. 2001. Vol. 12. P. 2099–2107.

8. Ханчаев Ш.Ю. Особенности внутриклеточного транспорта и биологическая активность рицина: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.25. М., 2009.

9. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants // Biochim. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1154. P. 237–282.

10. Moisenovich M., Tonevitsky A., Agapov I., Niwa H., Schewe H., Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells // Eur. J. Cell Biol. 2002. Vol. 81. P. 529–538.

11. Wallace W., Schaefer L.H., Swedlow J.R. A working-person's guide to deconvolution in light microscopy // Bio-techniques. 2001. Vol. 31. P. 1076–1078, 1080, 1082.

12. Ханчаев Ш.Ю., Агапов И.И., Мойсенович М.М., Рамонова А.А., Богородский С.Э., Мусаэлян И.С., Понов В.К. Цитотоксическая активность вискумина, инкапсулированного в полилактидную матрицу с помощью сверхкритического диоксида углерода // Биотехнология. 2008. Т. 5. С. 43–49.

Поступила в редакцию
22.04.13

TOXIN CONCENTRATIONS IN THE ENDOSOMAL COMPARTMENT OF CELLS PRETREATED WITH RICIN AND VISCUMIN

Sh.Yu. Khapchaev, S.S. Gutor, Y.P. Kamynsky, E.E. Cremer, S.V. Kryvostechov, I.V. Mylto, A.G. Perschina, I.V. Petrova, I.V. Saltycova, N.S. Subbotina, K.V. Kchvorylova

We estimated the volume of an internalized toxin containing intracellular compartment and assessed the toxin concentration therein. We hypothesize a role for toxin aggregates in a lethal-to-cell translocation of A-chain to cytosol.

Key words: ricin, viscumin, confocal microscopy, monoclonal antibody.

Сведения об авторах

Ханчаев Шамиль Юсуфович — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: shamikosha@mail.ru

Гутор Сергей Сергеевич — зав. лабораторией кафедры морфологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: info@cnilssmu.ru

Каминский Илья Петрович — канд. фарм. наук, мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-42-64-41; e-mail: medicff@sibmail.com

Кремер Елена Эдуардовна — мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: elenakremer@yandex.ru

Кривощёков Сергей Владимирович — лаборант-исследователь ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-52-98-32; e-mail: medicff@sibmail.com

Мильто Иван Васильевич — канд. биол. наук, доц. кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: milto_bio@mail.ru

Першина Александра Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: allysy@mail.ru

Петрова Ирина Валерьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: irinavall@mail.ru

Салтыкова Ирина Владимировна — канд. мед. наук, мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: info@cnilssmu.ru

Субботина Наталья Сергеевна — мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: trav-r@mail.ru

Хворилова Ксения Владимировна — мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-3822-53-04-23; e-mail: kseniahvorilova@gmail.com

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

ЭВОЛЮЦИЯ ТЕРМИНА “CELLULAR SENESENCE” И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ЦИТОГЕРОНТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**А.Н. Хохлов***(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru)*

Термин “клеточное старение” (cellular/cell senescence) был введен в обращение Леонардом Хейфликом для описания “возрастных” изменений нормальных эукариотических клеток при старении *in vitro*, т.е. при исчерпании ими митотического потенциала. В “классическом” варианте подразумевалось, что клетки “стареют” с помощью некоторого внутреннего механизма, вследствие чего в них появляются различные макромолекулярные дефекты (в первую очередь — повреждения ДНК). В настоящее же время, как правило, говоря о “клеточном старении”, подразумевают накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, которым не свойственно репликативное старение) определенных “биомаркеров старения” под влиянием различных внешних факторов (окислительного стресса, H_2O_2 , митомицина С, этанола, ионизирующей радиации, доксорубина и др.), вызывающих повреждение ДНК. Это явление было названо DDR (DNA Damage Response). Среди упомянутых биомаркеров — активность бета-галактозидазы рН 6,0, экспрессия белков p53 и p21, а также белков-регуляторов воспаления вроде IL-6 или IL-8, активация онкогенов и др. Таким образом, “старение” клеток происходит не само по себе, а вследствие воздействия ДНК-повреждающих агентов. Такой подход, на мой взгляд, хотя и очень важен для определения стратегии борьбы с раком, но уже в который раз уводит нас от изучения реальных механизмов старения организма. Необходимо подчеркнуть, что в используемой в моей лаборатории модели “стационарного старения” мы тоже фиксируем появление определенных биомаркеров старения в культивируемых клетках, однако в этом случае они возникают из-за ограничения их пролиферации с помощью контактного торможения, т.е. вполне физиологического воздействия, которое само по себе не вызывает никаких повреждений в клетках (ситуация очень похожа на ту, что мы наблюдаем в многоклеточном организме).

Ключевые слова: старение, программа, биомаркеры, пролиферация клеток, клеточное старение, ассоциированная со старением бета-галактозидаза, злокачественная трансформация, повреждения ДНК.

Хотя мы сейчас не так уж часто об этом вспоминаем, но основы цитогеронтологии были заложены еще в конце XIX в. Августом Вейсманом [1, 2]. Что касается самого термина “цитогеронтология”, то он был введен в обращение Леонардом Хейфликом [3, 4] для описания исследований старения *in vitro*, выражающегося в “возрастных” изменениях культивируемых нормальных клеток при исчерпании ими митотического потенциала (собственно, именно этот феномен и был назван впоследствии “феноменом Хейфлика”). Позже цитогеронтологией стали называть любые исследования механизмов старения в экспериментах на культивируемых клетках [5—11].

Надо сказать, что именно А. Вейсман впервые четко противопоставил клетки зародышевого пути, популяция которых в принципе является бессмертной, соматическим клеткам, которые стареют и умирают. Таким образом, краеугольным камнем его взглядов является положение о существовании смертной

сомы и бессмертной “зародышевой плазмы” (Keim-plasma). Впрочем, необходимо подчеркнуть, что Вейсман так и не дал четкого определения, что же это такое — клеточное старение. Возможно, это и явилось причиной тех выводов, которые сделал Алексис Каррель [12, 13], создав в начале XX в. экспериментальные основы цитогеронтологии.

Каррель захотел проверить, действительно ли соматические клетки высших животных, будучи выделенными из организма, не смогут размножаться бесконечно, “состарятся” и умрут. Именно он разработал методику культивирования во флаконах эпителиальных или фибробластоподобных клеток животных, причем эта методика практически в неизменном виде используется до настоящего времени. Однако результаты экспериментов Карреля совсем не укладывались в концепцию смертной сомы. Некоторые штаммы клеток, полученных из куриных эмбрионов, ему удалось культивировать практически

неограниченно долго безо всяких признаков деградации культур. Поэтому в XX в. ученые-геронтологи в течение почти 50 лет полагали, что соматические клетки способны к неограниченному размножению. Лишь поставленные в 50—60-х гг. эксперименты Свима и Паркера [14], а затем и Хейфлика [15—17] позволили установить, что результаты Карреля были, по-видимому, артефактом. Как оказалось, практически все нормальные клетки животных обладают ограниченной способностью к пролиферации, выдерживая в культуре не более 100—120 делений (что соответствует приблизительно 50 удвоениям клеточной популяции).

Было сформулировано множество концепций, пытающихся объяснить суть феномена Хейфлика и связать его со старением *in vivo*. Однако впоследствии все они были отвергнуты в результате открытия теломерного “счетчика” [18], определяющего ограниченную способность нормальных клеток к размножению и то, что еще Хейfliком было названо термином “клеточное старение” (*cellular senescence*), который на протяжении многих лет фактически использовался для обозначения феномена его имени (см. выше). Необходимо подчеркнуть, что между клеточным старением и старением многоклеточного организма нет прямых причинно-следственных связей [6—8, 10, 19—22]. Вся доказательная база геронтологической ценности этого феномена основывается лишь на целом ряде **корреляций** типа пониженного пролиферативного потенциала фибробластов, полученных от пациентов с прогерией, прямой связи этого показателя с видовой продолжительностью жизни или обратной — с возрастом донора клеток и т.п.

Главное, на что делался упор при обосновании целесообразности исследований механизмов старения на модели Хейфлика, это то, что при увеличении количества удвоений клеточной популяции в культивируемых нормальных клетках происходят различные изменения на самых разных уровнях, сходные с таковыми в клетках стареющего организма. Иными словами, при старении *in vitro* в клетках либо что-то накапливается, либо что-то исчезает точно так же, как при старении *in vivo*. Таким образом, и в этом случае речь идет о **корреляции** — на этот раз о корреляции изменений определенных биомаркеров старения.

Несмотря на “коррелятивность” модели Хейфлика, она получила широкое распространение, и с ее помощью были получены многочисленные данные, позволившие прояснить многие аспекты функционирования живых организмов. В частности, это касается механизмов развития, а также злокачественной трансформации. Однако, как ни печально, изучение старения *in vitro* практически никак не помогло геронтологам в понимании фундаментальных механизмов старения и долголетия. Более того, как мне кажется, произошедшая в последние годы трансформация термина “клеточное старение” (*cellular se-*

nescence) даже нанесла серьезный вред современной экспериментальной геронтологии.

Изначально считалось, что клеточное старение происходит “само по себе”, т.е. его механизм является внутренним, а все последующие изменения в клетках — лишь **следствие** этого процесса. Собственно, именно так и функционирует открытый А.М. Оловниковым механизм укорочения теломер при каждом клеточном делении [18]. В 80-х гг. XX в. мной была сформулирована концепция старения [22], согласно которой именно происходящее при развитии организма ограничение клеточной пролиферации (вследствие образования популяций высокодифференцированных постмитотических или очень медленно размножающихся клеток) является причиной возрастного накопления в клетках различных макромолекулярных дефектов (главным образом повреждений ДНК). Эта концепция позволяла легко объяснить “возрастные” изменения клеток при старении *in vitro* тем, что на поздних пассажах размножение клеток замедляется, возникающие спонтанные повреждения ДНК перестают в должной степени “разбавляться” с помощью появления новых клеток, и мы наблюдаем их накопление в расчете на всю клеточную популяцию. Последнее обстоятельство очень важно, ибо некоторые клетки полностью сохраняют свою способность делиться, однако их доля с пассажами непрерывно уменьшается, так что “старение” клеток фиксируется именно на уровне всей клеточной **популяции**. Собственно, разработанная нами модель “стационарного старения” [21—26] и была основана на 100%-м подавлении размножения культивируемых клеток с помощью контактного торможения либо какого-нибудь другого физиологического способа ограничения пролиферации, что в результате приводило к накоплению в клетках “возрастных” повреждений. И в этом случае мы сначала заставляли клетки “стареть”, а лишь потом фиксировали появление в них тех или иных биомаркеров старения *in vivo* (например, разрывов ДНК). Таким образом, при “классическом” подходе подразумевалось, что клетки “стареют” с помощью некоторого внутреннего механизма, вследствие чего в них появляются различные макромолекулярные дефекты (в первую очередь — повреждения ДНК).

Однако в последние годы в термин “клеточное старение” (*cellular senescence* или *cell senescence*) все чаще и чаще вкладывается совсем другой смысл. В июле 2013 г. в Кембридже должна состояться международная конференция “Клеточное старение, рак и старение” (*Cell Senescence in Cancer and Ageing*), на которой планируют собраться многие признанные авторитеты в этой области. Непосредственно на первой странице интернет-сайта конференции организаторы поместили определение клеточного старения, которое (с учетом, естественно, и соответствующих публикаций участников конференции, а также их коллег — см., например, [27]) звучит следующим образом: «Клеточным старением называется устой-

чивая остановка пролиферации, вызванная различными молекулярными триггерами, включающими активацию онкогенов, а также избыточное количество клеточных делений. Кроме того, “сенесцентные” клетки характеризуются секрецией целого ряда стромальных регуляторов и регуляторов воспаления (так называемым “ассоциированным со старением секреторным фенотипом”), влияющих на функционирование соседних клеток, включая иммунокомпетентные. Целый ряд убедительных фактов свидетельствует о том, что клеточное старение представляет собой эффективный механизм подавления опухолевого роста. В то же время клеточное старение, возможно, вносит свой вклад в старение тканей и всего организма».

Таким образом, под “клеточным старением” в первую очередь понимается накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, которым не свойственно репликативное старение) определенных “биомаркеров старения” (именно так, в кавычках, ибо в данном случае ни о каком реальном старении речь не идет) под влиянием различных внешних факторов (окислительного стресса, H_2O_2 , митомидин С, этанола, ионизирующей радиации, доксорубицина и др.), вызывающих повреждение ДНК. Это явление было названо DDR (DNA Damage Response — реакция на повреждения ДНК). Среди упомянутых биомаркеров старения — активность бета-галактозидазы pH 6.0, экспрессия белков p53 и p21, а также белков-регуляторов воспаления вроде IL-6 или IL-8, активация онкогенов и др. Таким образом, “старение” клеток в рамках данного определения происходит не само по себе, а **вследствие** воздействия ДНК-повреждающих агентов. Такой подход, на мой взгляд, хотя и очень важен для определения стратегии борьбы с раком, но уже в который раз уводит нас от изучения реальных механизмов старения организма. Сходное мнение было недавно выражено и известным геронтологом Д. Харманом в его коротком комментарии, опубликованном в журнале “Biogerontology” [28].

Необходимо подчеркнуть, что в используемой нами модели “стационарного старения” [21, 22, 24, 25] мы тоже фиксируем появление определенных биомаркеров старения в культивируемых клетках, однако в этом случае они возникают из-за ограничения их пролиферации с помощью контактного торможения, т.е. вполне физиологического воздействия, которое само по себе не вызывает никаких повреждений в клетках (ситуация очень похожа на ту, что мы наблюдаем в многоклеточном организме).

Наиболее популярным из упомянутых биомаркеров клеточного старения является активность бета-галактозидазы pH 6.0 (ассоциированная со старением

бета-галактозидаза, senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). Фермент β -галактозидаза, лизосомная гидролаза, обычно проявляет свою активность при pH 4.0, но в “сенесцентных” клетках эта активность может быть, с помощью определенных биохимических методов, обнаружена при pH 6.0. Целесообразность использования активности SA- β -Gal в качестве биомаркера старения была впервые постулирована в 1995 г. в работе Димри с соавт. [29], продемонстрировавших, что интенсивность экспрессии этого фермента возрастает при старении как *in vitro*, так и *in vivo*. В последующие годы данный биомаркер широко использовался в цитогеронтологических экспериментах для оценки “возраста” клеток, а в настоящее время является наиболее распространенным в работах (см., например, [30, 31]), основанных на не устраивающем меня определении клеточного старения. Однако параллельно стали появляться публикации, подчеркивавшие, что активность SA- β -Gal в клетках — не такой уж хороший биомаркер старения, ибо во многих случаях он зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследования и/или наличия определенных патологий, а также, что представляется мне наиболее важным, от пролиферативного статуса изучаемых клеток [32–38]. Складывается впечатление, что ограничение пролиферации клеток по той или иной причине (дифференцировка, контактное торможение, DDR, некоторые болезни) и является тем фактором, который вызывает стимуляцию экспрессии SA- β -Gal. Иными словами, даже в “молодых” клетках появляется SA- β -Gal, если им не давать размножаться. Совсем недавно мы, используя нашу упомянутую выше модель “стационарного старения”, показали [39], что в находящейся в стационарной фазе роста культуре трансформированных клеток китайского хомячка растет со временем доля клеток, в которых методом Димри с соавт. определяется SA- β -Gal. Помимо прочего этот процесс сопровождается, с одной стороны, увеличением в клетках содержания поли(ADP-рибозы), а с другой — снижением их способности синтезировать поли(ADP-рибозу) в ответ на повреждение ДНК под воздействием H_2O_2 .

Данные такого рода, на мой взгляд, служат дополнительным доказательством жизнеспособности упомянутой выше концепции старения, постулирующей решающую роль ограничения пролиферации клеток в накоплении в них различных макромолекулярных дефектов (наиболее важные из них — повреждения ДНК), приводящих в свою очередь к ухудшению функционирования органов и тканей и дальнейшему увеличению вероятности смерти макроорганизмов [19, 21, 22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weismann A. Die Kontinuitat des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena: G. Fisher Verlag, 1885.

2. Weismann A. Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung. Jena: G. Fisher Verlag, 1892.

3. Hayflick L. Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
4. Hayflick L. How and why we age. New York: Ballantine Books, 1996. 400 p.
5. Kirkwood T.B., Cremer T. Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress // Hum. Genet. 1982. Vol. 60. N 2. P. 101–121.
6. Хохлов А.Н. Итоги и перспективы цитогеронтологических исследований на современном этапе // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1143–1148.
7. Хохлов А.Н. Геронтологические исследования на клеточных культурах: от организма к клетке и обратно // Проблемы старения и долголетия. 2008. Т. 17. № 4. С. 451–456.
8. Хохлов А.Н. Тестирование геропротекторов в экспериментах на клеточных культурах: за и против // Проблемы старения и долголетия. 2009. Т. 18. № 1. С. 32–36.
9. Khokhlov A.N. The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Eds. F. Licastro, C.M. Caldarera. Bologna: CLUEB, 1992. P. 209–216.
10. Khokhlov A.N. Cytoogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // Russ. J. Dev. Biol. 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
11. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytoogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
12. Carrel A. Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue // J. Exp. Med. 1912. Vol. 17. N 1. P. 14–19.
13. Carrel A. Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue // J. Exp. Med. 1913. Vol. 18. N 3. P. 287–289.
14. Swim H.E., Parker R.F. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially // Amer. J. Hyg. 1957. Vol. 66. N 2. P. 235–243.
15. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. 1961. Vol. 25. N 3. P. 585–621.
16. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. 1965. Vol. 37. N 3. P. 614–636.
17. Rattan S.I.S. “Just a fellow who did his job...”, an interview with Leonard Hayflick // Biogerontology. 2000. Vol. 1. N 1. P. 79–87.
18. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. № 6. С. 1496–1499.
19. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytoogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
20. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // Russ. J. Gen. Chem. 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
21. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
22. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.
23. Vilenchik M.M., Khokhlov A.N., Grinberg K.N. Study of spontaneous DNA lesions and DNA repair in human diploid fibroblasts aged in vitro and in vivo // Studia biophysica. 1981. Vol. 85. N 1. P. 53–54.
24. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.
25. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.
26. Akimov S.S., Khokhlov A.N. Study of “stationary phase aging” of cultured cells under various types of proliferation restriction // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 520.
27. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer // Annu. Rev. Physiol. 2013. Vol. 75. P. 685–705.
28. Harman D. About “Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009” // Biogerontology. 2009. Vol. 10. N 6. P. 783.
29. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. N 20. P. 9363–9367.
30. Lawless C., Wang C., Jurk D., Merz A., von Zglinicki T., Passos J.F. Quantitative assessment of markers for cell senescence // Exp. Gerontol. 2010. Vol. 45. N 10. P. 772–778.
31. Sikora E., Arendt T., Bennett M., Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research // Ageing Res. Rev. 2011. Vol. 10. N 1. P. 146–152.
32. Yegorov Y.E., Akimov S.S., Hass R., Zelenin A.V., Prudovsky I.A. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells // Exp. Cell Res. 1998. Vol. 243. N 1. P. 207–211.
33. Krishna D.R., Sperker B., Fritz P., Klotz U. Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? // Mech. Ageing Dev. 1999. Vol. 109. N 2. P. 113–123.
34. Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? // Exp. Cell Res. 2000. Vol. 257. N 1. P. 162–171.
35. Choi J., Shendrik I., Peacocke M., Peehl D., Buttyan R., Ikeguchi E.F., Katz A.E., Benson M.C. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia // Urology. 2000. Vol. 56. N 1. P. 160–166.
36. Untergasser G., Gander R., Rumpold H., Heinrich E., Plas E., Berger P. TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence // Exp. Gerontol. 2003. Vol. 38. N 10. P. 1179–1188.
37. Kang H.T., Lee C.J., Seo E.J., Bahn Y.J., Kim H.J., Hwang E.S. Transition to an irreversible state of senescence in HeLa cells arrested by repression of HPV E6 and E7 genes // Mech. Ageing Dev. 2004. Vol. 125. N 1. P. 31–40.
38. Cristofalo V.J. SA beta Gal staining: biomarker or delusion // Exp. Gerontol. 2005. Vol. 40. N 10. P. 836–838.
39. Vladimirova I.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., Shram S.I. “Age-related” changes of the poly(ADP-ribosyl)ation system in cultured Chinese hamster cells // Visualizing of senescent cells in vitro and in vivo. Programme and abstracts, Warsaw, Poland, 15–16 December 2012. Warsaw, Poland, 2012. P. 108–109.

EVOLUTION OF THE TERM “CELLULAR SENESCENCE” AND IMPACT OF THIS EVOLUTION ON THE CURRENT CYTOGERONTOLOGICAL RESEARCH

A.N. Khokhlov

The term “cellular senescence” (“cell senescence”) was put into circulation by Leonard Hayflick to describe the “age-related” changes in normal eukaryotic cells during aging in vitro, i.e., the exhaustion of their mitotic potential. In the “classic” version it was implied that the cells “grow old” with the help of some internal mechanism that leads to accumulation of various intracellular macromolecular defects (primarily — DNA damage). At present, as a rule, speaking of “cellular senescence” means accumulation/appearance in the cells (most often — transformed cells which do not demonstrate replicative senescence) of certain “biomarkers of aging” under the influence of various external factors (oxidative stress, H₂O₂, mitomycin C, ethanol, ionizing radiation, doxorubicin, etc.) that cause DNA damage. This phenomenon has been called DDR (DNA Damage Response). Among these biomarkers — senescence-associated beta-galactosidase activity, expression of p53 and p21 proteins, as well as of proteins involved in the regulation of inflammation like IL-6 or IL-8, activation of oncogenes, etc. Thus, “aging/senescence” of the cells does not occur by itself, but because of the impact of DNA-damaging agents. This approach, in my opinion, although is very important to define a strategy to fight cancer, but, yet again, takes us away from the study of the real mechanisms of aging. It should be emphasized that within the scope of “stationary phase aging” model developed in my lab, we also register the occurrence of certain biomarkers of aging in cultured cells, but in this case they arise due to the restriction of their proliferation by contact inhibition — a rather physiological impact, which in itself does not cause any damage to the cells (the situation is very similar to what we see in a whole multicellular organism).

Key words: *aging, program, biomarkers, cell proliferation, cellular senescence, senescence-associated beta-galactosidase, malignant transformation, DNA damage.*

Сведения об авторе

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК 582.263

ВЛИЯНИЕ ПИРОКАТЕХИНА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

А.Г. Недосекин, К.П. Хазанова, Л.Б. Братковская, С.Е. Плеханов

(кафедра гидробиологии; e-mail: N-biolog@yandex.ru; plekhanovse@yandex.ru)

Уменьшение интенсивности замедленной флуоресценции хлорофилла и подавление роста численности экспериментальной популяции *Scenedesmus quadricauda* под воздействием пирокатехина свидетельствует о снижении эффективности световых реакций фотосинтеза, что определяет ухудшение продукционных свойств водорослей.

Ключевые слова: микроводоросли, пирокатехин, фотосинтетическая активность.

Фенольные соединения содержатся в сточных водах многих промышленных предприятий, являются важными компонентами естественного круговорота органических веществ и в то же время — одни из наиболее вредных и распространенных токсических агентов, опасных для фитопланктона — основы функционирования водных экосистем. Возникает необходимость исследования действия этого вида загрязнений на функциональные показатели фитопланктона. Постоянный рост требований к нормированию загрязняющих веществ обуславливает поиск высокочувствительных откликов биосистем на загрязнения на клеточном и субклеточном уровнях, а также необходимость определения механизмов их действия [1, 2].

Настоящая работа восполняет недостаток сведений о действии пирокатехина на функциональное состояние развивающейся культуры хлорококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* по ростовым и фотосинтетическим характеристикам, связанным с эффективностью первичных реакций фотосинтеза на уровне фотосистемы 2.

Материалы и методы

В опытах использовали аксеничные накопительные культуры водорослей *Scenedesmus quadricauda* Breb. DMMSU S-2 из коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Их культивирование проводили на среде Бенеке стандартными методами, учет клеток — прямым счетом в камере Горяева.

Пирокатехин вносили в экспериментальные сосуды в виде водных растворов. Его количественное определение в суспензии проводили спектрофотометрическим методом [3]. Концентрации пирокатехина (1,1 и 55 мг/л) подбирали в предварительных опытах так, чтобы их действие было значимым, но не приводило к гибели культуры.

Скорость фотоиндуцированного выделения кислорода определяли с использованием мембранного электрода закрытого типа [4] в термостатированной ячейке объемом 1 мл.

Интенсивность замедленной флуоресценции в суспензии водорослей измеряли с помощью цилиндрического фосфороскопа со временем между возбуждением и регистрацией свечения 1,2 мс [5, 6].

Результаты

Пирокатехин (ортодигидроксибензол) наряду с гидрохиноном и резорцином является типичным фенольным соединением загрязненных сточных вод. Он отличается химической лабильностью и способностью к автоокислению или окислению с участием растительных оксидаз, входя, таким образом, в схему трансформации фенольных соединений: бензол—фенол—пирокатехин—*o*-бензохинон—продукты окислительной конденсации [3].

Анализ численности клеток водоросли *S. quadricauda* в присутствии пирокатехина (рис. 1) показал наличие фазности токсического действия. Фаза угнетения роста экспериментальной популяции сменялась фазой восстановления или даже стимуляции. Действие пирокатехина особенно эффективно в течение 2—3 сут, увеличение концентрации до 55 мг/л приводит к удлинению лаг-фазы и подавлению роста численности в течение всего эксперимента.

Этапы развития токсического эффекта соответствуют процессу дефеноляции культуральной среды. Убыль пирокатехина из суспензии клеток (рис. 1) можно объяснить автоокислением и биохимической деструкцией, обусловленной активностью фенолоксидаз, пероксидаз и, возможно, микросомальной активностью [3, 7].

Скорость фотоиндуцированного выделения кислорода отражает скорость электронного транспорта

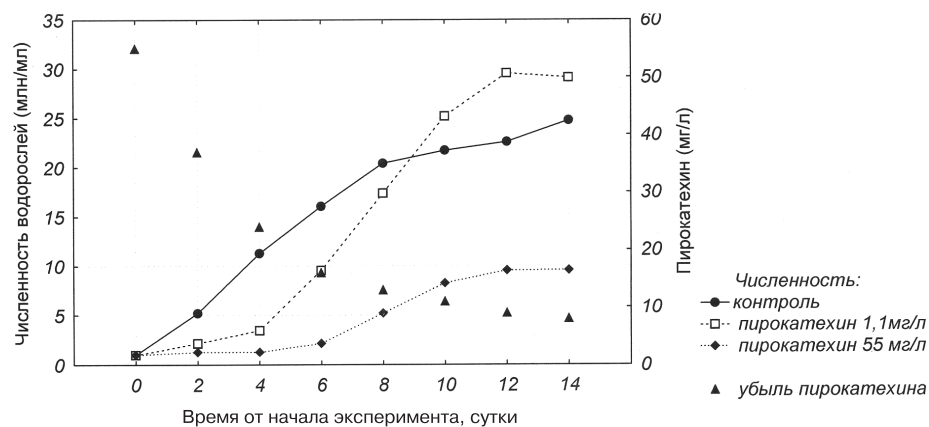


Рис. 1. Развитие культуры *S. quadricauda* и убыль пирокатехина в культуральной среде

всей электрон-транспортной цепи от H_2O до CO_2 . Она зависит как от световых, так и от темновых реакций фотосинтеза.

При действии пирокатехина в течение первых 2—3 сут обнаружена стимуляция скорости выделения кислорода (рис. 2). Возможно, этот эффект обусловлен акцепцией электронов пирокатехином или

Кроме того, ранее показано, что фенольные соединения с *o*-оксигруппами являются реакционноспособными интермедиатами и могут акцептировать электроны из электрон-транспортной цепи после фотосистемы 2. Донорами электронов для них может служить восстановленный цитохром с [10]. Приведенные данные указывают на нарушение пирокатехином функционирования электрон-транспортной цепи и фотовосстановления НАДФ⁺.

Способность соединений фенольного ряда к разобщению окислительного фосфорилирования обусловила их использование в качестве гербицидов — ингибирующих разобщителей, способных в низких концентрациях действовать как разобщители, а в высоких — как ингибиторы фотосинтетического электронного транспорта [11, 12].

В наших опытах более высокая по сравнению с контролем скорость выделения кислорода сохранялась в присутствии пирокатехина до 9—10 сут опыта, а затем снижалась до уровня ниже контрольного, что в целом соответствует его элиминации из среды.

С активностью фотосистемы 2 тесно связана миллисекундная замедленная флуоресценция хлорофилла, интенсивность которой отражает интактность реакционных центров фотосистемы 2. Интенсивность стационарного уровня замедленной флуоресценции успешно используется в настоящее время для целей биотестирования и диагностики состояния фотосинтетического аппарата клеток микроводорослей при действии загрязнений [6, 15].

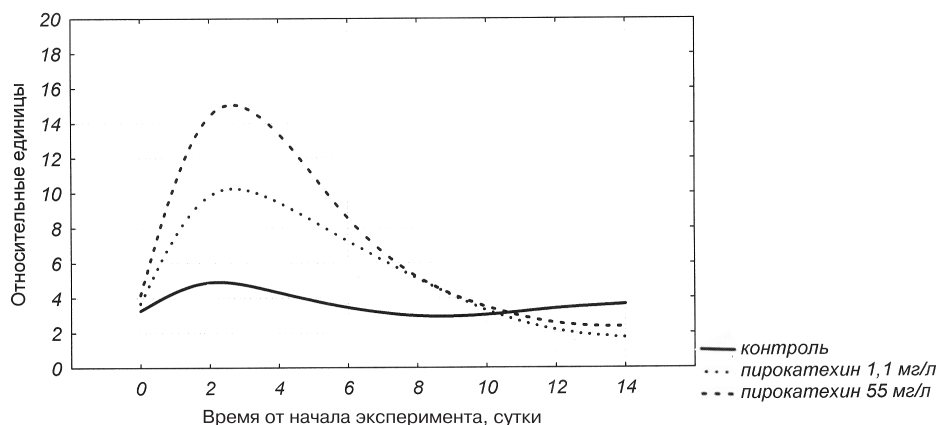


Рис. 2. Влияние пирокатехина на скорость фотоиндуцированного выделения кислорода *S. quadricauda* в пересчете на 1 млн клеток (сглаживание способом взвешенных наименьших квадратов)

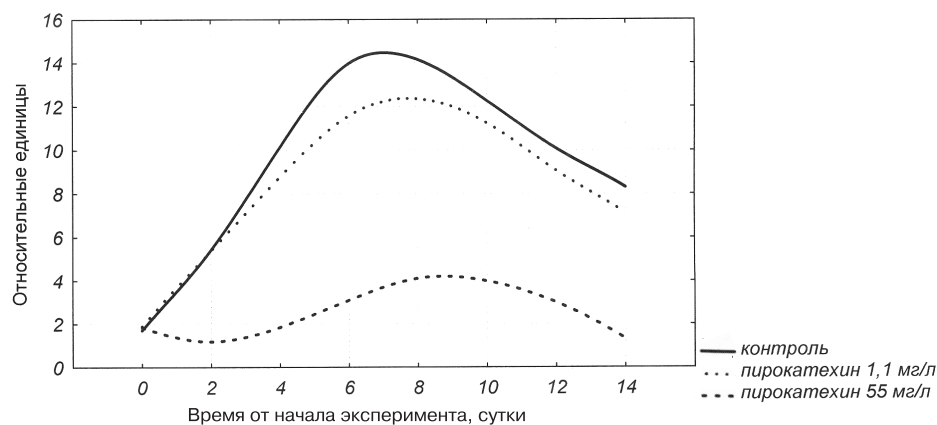


Рис. 3. Интенсивность замедленной флуоресценции хлорофилла в пересчете на 1 млн клеток при росте культуры в присутствии пирокатехина (сглаживание способом взвешенных наименьших квадратов)

Добавление в культуральную среду *S. quadricauda* пирокатехина приводило к снижению интенсивности замедленной флуоресценции клеток водорослей (рис. 3).

Снижение активности фотосистемы 2, которое определяется подавлением скорости электронного транспорта и энергизации фотосинтетической мембраны, соответствует величине добавок токсиканта. Это указывает на ухудшение состояния фотосинтетического аппарата клеток, которое ведет к снижению продукционного потенциала водоросли.

Замедленная флуоресценция хлорофилла сложным образом зависит от скорости электронного транспорта и энергизации мембран тилакоидов. Это затрудняет однозначную интерпретацию результатов эксперимента, но позволяет определять интактность фотосинтетического аппарата клеток водорослей. Учитывая стимуляцию скорости выделения кислорода при действии пирокатехина по сравнению с контролем, можно полагать, что снижение интен-

сивности замедленной флуоресценции обусловлено снижением степени энергизации мембран тилакоидов, а после 10 сут и подавлением электронного транспорта. В этом и выражается нарушение интактности фотосинтетического аппарата клеток, которое ведет к снижению продукционных возможностей водоросли.

Из проведенных опытов следует, что действие пирокатехина проявляется сразу после его добавления в культуральную среду, что отражается на изменении скорости фотоиндуцированного выделения кислорода и интенсивности стационарного уровня замедленной флуоресценции хлорофилла.

Можно полагать, что в использованных нами концентрациях пирокатехин действует в 1–10-е сут развития культуры *S. quadricauda*, подавляя энергизацию фотосинтетических мембран, что приводит к нарушению фотофосфорилирования, снижению эффективности фотосинтеза, подавлению развития водорослей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yen J.N., Lin K.H., Wang Y.S. Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organisms // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2002. Vol. 52. N 2. P. 113–116.
2. Huang G.L., Mao Y., Headley J.V., Sun H.V. Temporal changes in the toxicity of pentachlorophenol to *Chlorella pyrenoidosa* algae // *Environ. Sci. Health. Biol.* 2003. Vol. 38. N 5. P. 551–559.
3. Стом Д.И. Фитотоксичность и механизм детоксикации фенолов водными растениями: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Киев, 1982. 48 с.
4. Коваленко Е.А., Березовский В.А., Энштейн И.М. Полярографическое определение кислорода в организме. М.: Медицина, 1975. 231 с.
5. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. М.: Наука, 1990. 200 с.
6. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. Замедленная флуоресценция растений и водорослей: теоретические и практические аспекты. М.: Альтекс, 2011. 202 с.
7. Новиков К.Н. Роль активных форм кислорода в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2004. 45 с.
8. Vermaas W.F.J., Arntzen C.J. The synthetic quinines influencing herbicide binding and photosystem II electron transport. The effects of triazine-resistance on quinine binding properties in thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1983. Vol. 725. P. 483–491.
9. Стом Д.И., Бейм А.М. Действие фенолов на некоторые виды водорослей // *Гидробиол. журн.* 1976. Т. 12. № 6. С. 53–57.
10. Красновский А.А., Михайлова Е.С. Восстановление цитохрома с в присутствии хинонов; действие света // *Докл. АН СССР.* 1973. Т. 212. № 1. С. 237–239.
11. Федтке К. Биохимия и физиология действия гербицидов. М.: Агропромиздат, 1985. 223 с.
12. Holt J.S., Powles S.B., Holtum J.A.M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1993. Vol. 44. P. 203–229.
15. Brack W., Frank H. Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1998. Vol. 40. N 1–2. P. 34–41.

Поступила в редакцию
24.05.12

INFLUENCE OF PYROCATECHOL ON CHARACTERISTICS OF PHOTOSYNTHESIS IN ALGAE CULTURE

A.G. Nedosekin, K.P. Khazanova, L.B. Bratkovskaya, S.E. Plekhanov

Reduced intensity of delayed fluorescence of chlorophyll and suppressed growth recorded in experimental population of *Scenedesmus quadricauda* under influence of pirocatechol demonstrate reduction in efficiency of light reactions of photosynthesis, which, in turn, determines deterioration of algae productivity.

Key words: microalgae, pirocatechol, activity of photosynthesis.

Сведения об авторах

Недосекин Андрей Георгиевич — канд. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-433-37-83; e-mail: N-biolog@yandex.ru

Хазанова Ксения Петровна — аспирантка, кафедра гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-38; e-mail: mgu-gidro@yandex.ru

Братковская Любовь Борисовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: +7-916-272-01-86; e-mail: Profkom-bio@mail.ru

Плеханов Сергей Елисеевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-499-36-55; +7-916-177-61-99; e-mail: plekhanovse@yandex.ru

УДК 57.04, 59.085

СПЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ГОЛОВАСТИКОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ И СЕРОЙ ЖАБЫ, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ИМИТАЦИИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СВИНЦОМ И ЖЕЛЕЗОМ

Е.А. Северцова, А.И. Никифорова, Д.Р. Агильон Гуттиеррес

(кафедра биологической эволюции, e-mail: SevertsovaEA@gmail.com)

Визуальный, спектрохимический и гистохимический анализы головастика двух видов бесхвостых амфибий *Rana temporaria* L. и *Bufo bufo* L., развивавшихся в условиях имитации загрязнения воды свинцом и железосодержащими сплавами, продемонстрировали алиментарный путь поступления ионов этих металлов в организм. Накопление ионов этих металлов происходит в тканях кишечника и печени и усиливается по мере развития.

Ключевые слова: головастик, железо, свинец, аккумуляция, гистохимия.

Влияние тяжелых металлов на раннее развитие амфибий в настоящее время изучается довольно широко. Связано это с проблемой разработки методов биоиндикации аккумуляции поллютантов различной природы именно в водных экосистемах. Как отмечают многие авторы, высокие концентрации таких ионов металлов, как алюминий (Al), свинец (Pb), цинк (Zn), кадмий (Cd), ртуть (Hg), серебро (Ag), медь (Cu), мышьяк (As), марганец (Mn), молибден (Mo) и сурьма (Sb), оказывают существенное влияние на ход развития амфибий [1]. К примеру, загрязнение водоема ионами алюминия может приводить к замедлению развития личинок амфибий, а также к возникновению у них аномалий. Кроме того, было показано, что в высоких концентрациях алюминий может быть летален для амфибий [2–5]. В условиях повышенного содержания ионов тяжелых металлов в водоеме у обитающих в нем животных могут возникать физиологические изменения, например повышение уровня метаболизма [6, 7]. Воздействие высоких концентраций металлов способно нарушать работу эндокринной системы и вызвать подавление иммунитета [8]. Показано, что поведенческие реакции также могут меняться под их действием [9].

Свинец во всем мире относится к наиболее распространенным поллютантам. Более чем 4 млн т свинца используется каждый год в аккумуляторных батареях, пигментах красителей, сплавах и боеприпасах [10]. Антропогенная деятельность на протяжении последних 40 лет привела к значительному увеличению распределения свинца, поскольку этот элемент может передаваться через многие трофические цепи и накапливаться в тканях живых организмов, постепенно влияя на кровообращение, работу нервной, выделительной и репродуктивной систем, а также на поведение амфибий [10]. Показано, что свинец оказывает глубокое влияние на развитие скелета головастика

на пред- и постметаморфозных стадиях [11]. Лягушки и головастики, подвергшиеся обработке свинцом в концентрации 1 мг/л в течение 7 дней, менее эффективно избегают нападения хищников [12].

В отличие от свинца железо — важнейший компонент нормального метаболизма позвоночных животных, в том числе и амфибий. Концентрации его в организме невелики и составляют примерно 0,01% от массы тела животного. Железо незаменимо в процессах кроветворения и внутриклеточного обмена. Примерно 55% железа входит в состав гемоглобина эритроцитов, около 24% участвует в формировании миоглобина и примерно 21% депонируется в печени и селезенке [13]. Тем не менее высокие концентрации железа могут вызывать угнетение активности пищеварительных ферментов, нарушать проницаемость клеточных мембран [14]. На развитие амфибий высокие концентрации железа также оказывают негативное воздействие, хотя для разных стадий разных видов уровень концентрации железа может быть различным. Так, при концентрации ионов железа в воде от 20 до 30 мг/л наблюдается 100% смертность головастика *Bufo boreas* [15]. В меньших концентрациях железо может приводить к замедлению развития, что, например, показано для зародышей шпорцевой лягушки [16].

Таким образом, два металла, свинец и железо, представляют собой достаточно обычные поллютанты урбанизированных территорий. Они, несомненно, способны оказывать влияние на ход нормального развития амфибий. Большинство исследований посвящено изучению влияния растворимых соединений данных металлов на амфибий. Тем не менее загрязнение водоемов, как правило, характеризуется не столько загрязнением растворимых солей, сколько наличием в водоемах металлических конструкций. Личиночные стадии развития амфибий являются эврифагами, питающимися соскребыванием бактериаль-

ного нароста с поверхности подводных частей растений, донных осадков и т.д. Особенности их поведения не исключают возможности соскребывания головастиками поверхности металлсодержащих конструкций. Целью нашей работы было исследование характера проникновения ионов металлов с поверхности железо- и свинецсодержащих конструкций в организм головастиков.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны два наиболее типичных для средней полосы России представителя бесхвостых амфибий — лягушка травяная (*Rana temporaria* L.) и жаба серая (*Bufo bufo* L.). Эксперименты проводили на Звенигородской биологической станции МГУ с мая по июль 2011 г. на головастиках, выращенных из икры, собранной в местных водоемах. Всего было задействовано 12 кладок амфибий каждого вида. Кладки икры разделяли на три визуально равные части и помещали в индивидуальные аквариумы с объемом воды 20 л с водой из нативного водоема. В аквариумы к животным первой экспериментальной группы были добавлены строительные гвозди (56 граммов на литр воды), в аквариумы второй экспериментальной группы — шарики свинцовой охотничьей дробы (30 граммов на литр воды), оставшаяся третья группа животных служила в качестве контрольной. Головастиков содержали в условиях естественного светового дня, кормили измельченными листьями крапивы. Стадии развития головастиков определяли по таблицам нормального развития для *R. temporaria* [17] и таблицам нормального развития для *B. bufo* [18].

В ходе эксперимента головастиков разных стадий фиксировали в 10%-м формалине. Часть зафиксированного материала была использована для гистологических (патоморфологических) исследований органов головастиков, часть — для спектрохимического анализа тканей животных. В патоморфологическое исследование были включены: кожа с области “щеки”, сердце, печень, жабры, поджелудочная железа, кишечник и вторичные почки головастиков. Органы извлекали из фиксированных головастиков, подвергали стандартной гистологической обработке, заливали HISTOMIX EXTRA (“BioVitrum”) и получали срезы толщиной 4–5 мкм. Дополнительно были получены препараты серийных срезов тела животных в трансверсальной плоскости. С целью выявления трехвалентного железа в тканевых образцах препараты окрашивали по методу Перлса [19]. Для выявления свинца на срезах проводили качественную реакцию с использованием родизоната натрия (“Диаэм”) [20]. Препараты анализировали под микроскопом Axio Scope A1 (“Carl Zeiss”), микрофотографирование осуществляли камерой MRc.5 (“Carl Zeiss”).

Для определения концентрации накопленных ионов железа и свинца в Институте проблем техно-

логии микроэлектроники и особо чистых материалов Российской академии наук (ИПТМ) РАН (г. Черноголовка, Московская обл.) был проведен спектрохимический анализ тканей головастиков. На 39-й стадии развития у головастиков травяной лягушки и на 26-й стадии развития у серой жабы удаляли кишечник и анализировали отдельно ткани тела головастика и ткани с содержимым кишечника. На 43-й стадии развития травяной лягушки и на 34-й стадии развития серой жабы помимо отдельного анализа тканей тела и тканей кишечника в ряде случаев был проведен анализ тканей хвостовой пластины, печени и жабр. Формирование проб для проведения спектрохимического анализа методически не позволяло проанализировать каждого головастика в отдельности. В каждую пробу отбиралось по 7–12 головастиков из одной повторности для каждой серии эксперимента.

Химический анализ воды из исследованных водоемов был выполнен лабораторией источников водоснабжения Института “Водоканал”, НИИ “Проект” № Росс.RU001.510516. Состав воды оценивали по следующим показателям: мутность (мг/л), pH, общая жесткость (мг · экв/л); также была определена концентрация ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (мг · экв/л), Cl^- , SO_4^{2-} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} и Fe^{3+} (мг/л), HCO_3^- (мг · экв/л) и нефтепродуктов (мг/л).

Результаты и обсуждение

Проведение эксперимента по имитации загрязнения водоема железосодержащими и содержащими свинец сплавами показало, что наличие металлургических соединений в воде не ведет к существенным изменениям химического состава воды. В воде из нативного водоема содержание ионов железа составляло 320 мкг/л, а свинца — в концентрации 0,2 мкг/л в воде. В этих условиях проходило развитие контрольной группы. В аквариумах, куда соответственно добавляли ржавые гвозди для имитации загрязнения железом и свинцовую дробь для имитации загрязнения свинцом, концентрация этих элементов составляла 340 мкг/л железа и 0,3 мкг/л свинца. Такое незначительное увеличение концентраций, измеренное по окончании эксперимента, позволяет судить о фактическом отсутствии растворения этих элементов, которое наблюдалось бы при более кислом значении pH. Вода же, используемая для экспериментальной работы, имела нейтральные значения pH (в зависимости от аквариума от 6,9 до 7,2). Таким образом, добавление железо- и свинецсодержащих сплавов в экспериментальные аквариумы не привело к изменению общих условий развития по сравнению с контрольной группой. Однако условия эксперимента увеличили доступность поллютантов для головастиков, об этом позволяет судить визуальное сравнение кишечника животных в контрольных и экспериментальных группах (рис. 1). Вскрытие головастиков, развитие которых проходи-

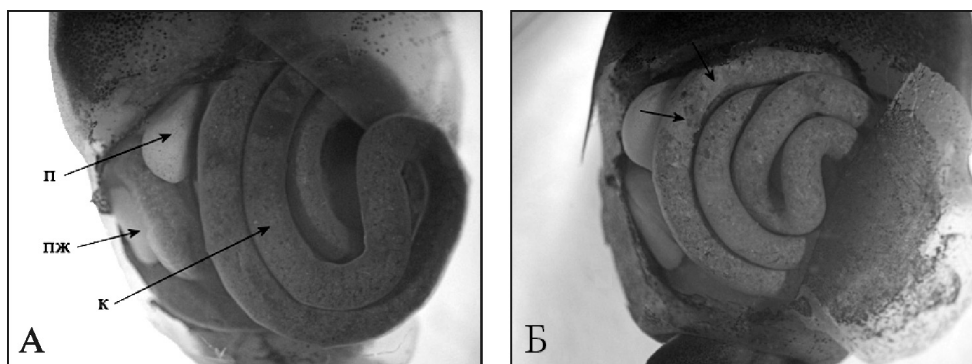


Рис. 1. Макроморфология внутренних органов головастика *B. bufo* на 34-й стадии развития, вид с вентральной стороны: А — головастик контрольной группы; Б — головастик, развивавшийся в условиях имитации загрязнения водоема железом; стрелками отмечены участки кишечника, содержащие крупные включения цвета ржавчины; к — кишечник, п — печень, пж — поджелудочная железа

ло в воде с железосодержащими сплавами, обнаружило наличие в содержимом кишечника включений с характерным цветом ржавчины (рис. 1, Б). У головастика, развивавшегося в воде с шариками свинцовой дробы, кишечник был наполнен серебристой массой.

Спектрохимический анализ тканей выявил тенденцию к аккумуляции железа и свинца в тканях головастика, развитие которых проходило в экспериментальных аквариумах (рис. 2). Пятикратные различия в уровне содержания ионов железа в тканях тела головастика наблюдаются на 39-й стадии развития *R. temporaria* контроля и эксперимента и семикратные — на 43-й стадии. У *B. bufo* аналогичные различия выражены еще сильнее: показана 19-кратная разница между содержанием железа в эксперименте и контроле для 34-й стадии развития.

В то же время анализ других тканей головастика выявил неравномерное накопление анализируемых элементов в разных системах организма. Наиболее высокие показатели содержания железа и свинца характерны для кишечника головастика. Концентрация свинца в кишечнике может превышать таковую в теле головастика в 9,4 раза на 34-й стадии развития серой жабы и в 13,15 раза на 43-й стадии развития головастика травяной лягушки. Различия в концентрации ионов железа в кишечнике и в тканях тела не менее существенны: у *B. bufo* в 8,1 раза, а у *R. temporaria* в 11,42 раза. Интенсивность аккумуляции исследуемых элементов в печени головастика *R. temporaria* не менее существенна. Концентрация железа в печени травяной лягушки была в 5,86 раза выше, чем в тканях тела, но в 1,94 раза меньше, чем в кишечнике. Содержание свинца в печени травяной лягушки в 2,31 раза выше, чем в тканях тела, но в 5,68 раза меньше, чем в кишечнике. У жабы концентрация железа в тканях печени не измерялась. Результаты анализа концентрации свинца для *B. bufo* показали, что в 1,84 раза его больше в печени, чем в тканях тела, но в 5,13 раз меньше, чем в кишечнике.

Сравнение 39-й и 43-й стадий развития травяной лягушки и 26-й и 34-й стадий соответственно для серой жабы продемонстрировало накопление исследуемых металлов по мере онтогенеза. Это свидетельствует об отсутствии или несовершенстве механизмов выведения их из организма. Другой возможной причиной может быть недостаточно репрезентативная выборка для спектрохимического анализа, отразившаяся на данных анализа по железу для травяной лягушки. У *R. temporaria* кон-

центрация железа в “теле” и в “кишечнике” снизилась на более поздней стадии развития.

Приведенные результаты свидетельствуют о преимущественно пероральном поступлении металлов в организм головастика. Это подтверждают и исследования [21], показавшие высокие концентрации некоторых металлов в разных отделах пищеварительного тракта озерной лягушки и зеленой жабы. Однако незначительное количество металлов в тканях жабр свидетельствует о том, что это далеко не единственный путь поступления ионов металлов в организм личинок бесхвостых амфибий. Некоторое их количество может попадать вместе с водой, которую головастики постоянно фильтруют, отцеживая пищевые частички и пропуская воду через жабры. Тем не менее концентрация металлов в тканях жабр настолько невелика (рис. 2), что рассматривать этот путь проникновения ионов в организм нецелесообразно. Головастики являются эврифагами. В естественных условиях они часто питаются детритом и донными отложениями [22], а основное депо металлов в водоемах — донные осадки. При экстраполяции результатов данного эксперимента на природные условия надо учитывать, что распространение металлов, депонированных в теле головастика, по пищевой цепи ограничено. Основные хищники, уничтожающие головастика, — это личинки *Ditistidae* и *Aeshnidae*, которые метаморфизуют и, следовательно, выносят какую-то часть металлов из водоемов. Выносят свою часть и метаморфизовавшие головастики. Однако едва ли этот вынос играет заметную роль в круговороте веществ. Можно считать, что головастики — не окончательное депо металлических поллютантов в антропогенных биоценозах.

Гистохимический анализ органов и тканей животных контрольной и экспериментальных групп был направлен на выявление путей распространения металлов, а также на определение мест их депонирования в организме головастика. Согласно исследованию, положительную реакцию на наличие соединений железа демонстрируют препараты печени и кишечника головастика обоих исследованных видов

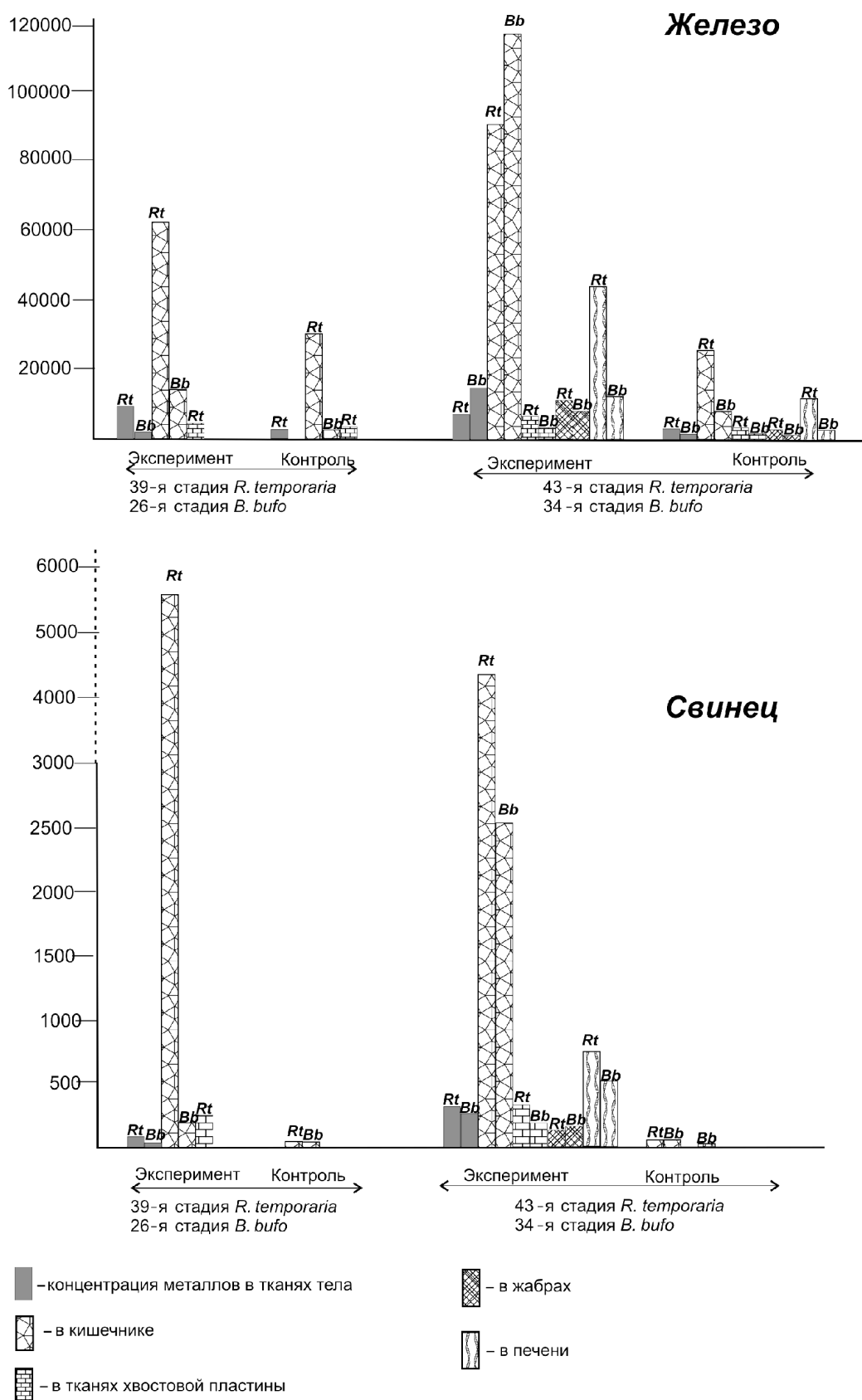


Рис. 2. Результаты спектрохимического анализа тканей головастиков *R. temporaria* и *B. bufo*

амфибий (рис. 3, 4). Полученный результат подтверждает результаты спектрохимического анализа тканей головастиков и выглядит биологически значимым, по-

скольку печень функционально связана с метаболизмом железа в организме животного и является органом естественного депонирования железа. Депозиты

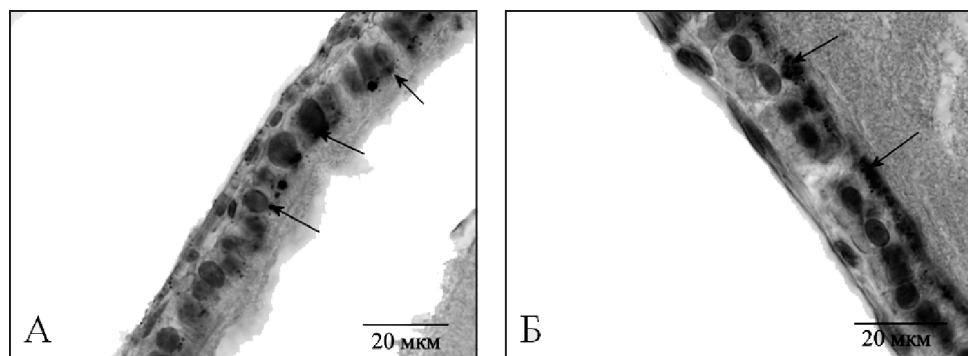


Рис. 3. Гистохимическое выявление железа в стенке кишечника *B. Bufo*: А — участок тонкого кишечника головастика контрольной группы на 34-й стадии развития; Б — участок тонкого кишечника головастика, развивавшегося в условиях имитации загрязнения водоема железом, 34-я стадия развития. Стрелками отмечены области выявления железа

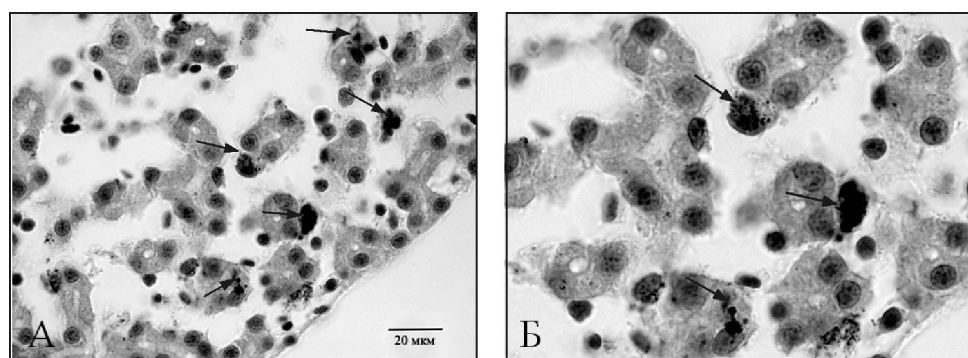


Рис. 4. Гистохимическое выявление железа в печени головастика *R. temporaria*, развивавшегося в условиях имитации загрязнения водоема железом. А — печень головастика на 43-й стадии развития; Б — увеличенный фрагмент А. Стрелками отмечены пигментсодержащие клетки печени, депонирующие железо

железа в печени головастика как контрольной, так и экспериментальных групп выявляются в ассоциации с клетками, содержащими черно-бурый пигмент (рис. 3). Наиболее вероятными кандидатами на роль клеток, аккумулирующих соединения железа, являются меланинсодержащие макрофаги, или купферовы клетки печени [23, 24]. В печени они функционируют как макрофаги, а также способны к аккумуляции железа в составе гемосидерина и ферритина. В отличие от пигментсодержащих клеток гепатоциты, имеющие каноническую морфологию, включения железа, выявляемые гистохимически, в цитоплазме не содержат. Окрашивание на железо характерно для отдельных участков тонкого кишечника как экспериментальной, так и контрольной групп головастика. Однако более интенсивный характер окрашивания

стенки кишечника у опытных животных указывает на повышенное поглощение железа в условиях эксперимента (рис. 4). Такие участки включения железа в стенке кишечника могут быть продолжительны, в некоторых случаях можно обнаружить непрерывные линии, что свидетельствует об интенсивном поглощении экзогенного железа из содержимого кишечника головастика экспериментальной группы. Положительная реакция на наличие соединений железа ассоциирована с апикальной, обращенной к просвету кишечника поверхностью энтероцитов (рис. 4).

Во вторичных почках накопление соединений железа выявлено не было. Это нетривиальный результат, поскольку почки связаны с выведением железа из организма и факт обнаружения его в секрете мог бы указывать на избыток железа.

Признаков аккумуляции свинца в различных органах головастика *R. temporaria* и *B. bufo*, детектируемых гистохимическими методами, обнаружено не было. Возможно,

дальнейшие исследования и более тонкий подбор методик позволят идентифицировать выявленный спектрехимическими методами факт аккумуляции ионов свинца в тканях.

Таким образом, гистохимический анализ тканей головастика на содержание в них ионов железа подтвердил результаты, полученные на основе спектрехимического анализа: основной путь поступления железа в организм головастика ионов металлов алиментарный. У личинок бесхвостых амфибий нет эффективного механизма выведения металлов, но существует механизм, смягчающий токсическое действие переизбытка железа. В качестве такого механизма могут выступать процесс поглощения ионов металлов макрофагами и депонирование в печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. State of the environment advisory council, 1996. An independent report presented to the commonwealth minister for the environment by the state of the environment advisory council. 46 p.
2. Clark K.L., La Zerte B. A laboratory study on the effects of aluminium and pH on amphibians eggs and tadpo-

les // Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences. 1985. Vol. 42. P. 1544—1551.

3. Freda J., Cavdek V., McDonald D. Role of organic complexation in the toxicity of aluminum to *Rana pipiens* embryos and *Bufo americanus* tadpoles // Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences. 1990. Vol. 47. P. 217—224.

4. Blaustein A.R., Romansic J.M., Kiesecker J.M., Hatch A.C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian populations declines // *Diversity and Distributions*. 2003. Vol. 9. P. 123—140.
5. Crawshaw G. Anurans (Anura, Salientia): Frogs, Toads // *Zoo and wild animal medicine* / Eds. M.E. Fowler, R.E. Miller. Saunders, 2003.
6. Rowe C.L., Kinney O.M., Nagle R.D., Congdon J.D. Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods // *Physiol. Zool.* 1998. Vol. 71. P. 27—35.
7. Rowe C.L., Hopkins W.A., Coffman V.R. Failed recruitment of southern toads (*Bufo terrestris*) in a trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effects that may lead to a local population sink // *Arch. Environment. Contam. Toxicol.* 2001. Vol. 40. P. 399—405.
8. Blaustein A.R., Kiesecker J.M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations // *Ecol. Letters*. 2002. Vol. 5. P. 597—608.
9. Wright K.M., Valls Badia X. Anfíbios // *Atlas de medicina, terapéutica y patología de animales exóticos* / Eds. R. Aguilar, S.M. Hernández-Divers, S.J. Hernández-Divers. Intermedica, 2005.
10. Humphreys D.J. Toxicología veterinaria. Interamericana McGraw-Hill, 1990.
11. Sparling D.W., Krest S., Ortiz-Santaliestra M. Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenoccephala* Tadpoles // *Arch. Environment. Contam. Toxicol.* 2006. Vol. 51. P. 458—466.
12. Jepson L. Medicina de animales exóticos. Elsevier, 2011.
13. Шапошникова И.А., Болгова И.В. Таблица Менделеева в живых организмах. М.: Бином, 2010.
14. Щербакова Е.Н. Оценка содержания некоторых тяжелых металлов в органах и тканях русского осетра и возможных последствий загрязнения вод Волги на его организм // *Экологические проблемы загрязнения водоемов Волжского бассейна, современные методы и пути их решения*. Волгоград, 2004.
15. Porter K.R., Hakanson D.E. Toxicity of mine drainage to embryonic and larval boreal toads (*Bufo boreas*) // *Copeia*. 1976. Vol. 2. P. 327—331.
16. Dawson D.A., McCormick C.A., Bantle J.A. Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) // *J. Appl. Toxicol.* 1985. Vol. 5. N 4. P. 233—44.
17. Дабагян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // *Объекты биологии развития*. М.: Наука, 1975. С. 442—462.
18. Gosner K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification // *Herpetologica*. 1960. Vol. 16. N 3. P. 183—190.
19. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Л.: Медицина, 1969. С. 424.
20. Кононский А.И. Гистохимия. Київ: Вища школа, 1976. С. 280.
21. Мисиора А.Н., Марченковская А.А. Влияние тепловых электростанций на накопление тяжелых металлов в органах и тканях различных видов земноводных // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, Екологія*. 2002. Vol. 10. N 1. P. 56—60.
22. Северцов А.С. Эволюционный стагиз и микроэволюция. М.: КМК, 2008. 174 с.
23. Bernini F., Gerzeli G. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians // *J. Anat.* 1999. Vol. 195. P. 19—25.
24. Barni S., Bertone V., Frascini A., Bernini F., Fenoglio C. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. // *J. Anat.* 2002. Vol. 200. P. 185—194.

Поступила в редакцию
11.10.12

METAL SOLIDS IN WATER CAUSE METAL ACCUMULATION IN TISSUE THROUGH INGESTION IN TWO AMPHIBIAN SPECIES

E.A. Severtsova, A.I. Nikiforova, D.R. Aguilon Gutierrez

Morphologic, spectrochemical and histochemical examination of *R. temporaria* and *B. bufo* tadpoles grown in water where fragments of steel and lead were introduced reveals ingestion as the entry path of iron and lead ions into the animals' body. Accumulation of lead and iron was detected in tadpoles' gut and liver, increasing in the course of their development.

Key words: tadpole, lead, iron, accumulation, histochemistry.

Сведения об авторах

Северцова Елена Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01; e-mail: SevertsovaEA@gmail.com

Никифорова Елена Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01.

Агильтон Гутierrez Давид Рамиро — аспирант кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01.

УДК 502 175 (075)

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ

А.С. Холоимова

(кафедра общей экологии; e-mail: holoimova_alex@mail.ru)

Существующие методы оценки качества среды уже не удовлетворяют современным требованиям, так как в их основе лежит сравнение количественных показателей загрязнения с ПДК, что существенно снижает достоверность получаемых результатов. Биологические методы экологической диагностики становятся приоритетными, так как они дают качественную оценку состояния окружающей среды, основываясь на изучении реакции живых организмов на загрязнение.

Ключевые слова: экологическая диагностика, биоиндикация, интегральная оценка качества окружающей среды.

В современной экологической практике диагностика состояния окружающей среды базируется, как показывают результаты поисковых и прикладных исследований, на методах дифференциальной диагностики загрязняющих веществ. Этот тип диагностики предполагает выборочный анализ состояния атмосферного воздуха, поверхностных вод и почвы, исходя из места, времени и перечня загрязняющих веществ. Но, несмотря на использование в данной деятельности достижений в области хроматографии, ядерно-магнитного резонанса, масс-спектрометрии и др., результаты подобного анализа не диагностируют в полной мере качество окружающей среды, ее пригодность для человека. При всем этом аналитические методы оказываются достаточно дороги, т.е. требуют больших затрат сил, средств и финансов.

Заключение о качестве среды требует интегральной характеристики ее состояния. Однако при всей значимости осуществления комплексной оценки состояния среды (включая физические, химические, социальные и др. аспекты) приоритетной остается именно биологическая. Причиной этого является тот факт, что именно состояние, самочувствие различных видов живых существ и самого человека оказывается ключевым для их жизнедеятельности.

Объекты и методы

Биологические методы, в отличие от аналитических, способствуют существенной экономии средств, так как не требуют специальной пробоподготовки, дорогостоящих реактивов, специальной приборной базы, высококвалифицированного персонала, а также в связи со специфическим свойством биологических систем способны проявлять обобщенную, или интегральную, реакцию на действие неблагоприятных

факторов, характеризуя направленность и скорость происходящих в среде обитания изменений.

Наиболее экономически выгодной из всех известных методов оценки качества окружающей среды биоиндикацию делает сохранение естественного жизненного процесса биоиндикатора, осуществление визуальной биоиндикации окружающей среды непосредственно в среде обитания биоиндикатора, а также малозатратные средства определения его внешних признаков (палетка, сачок, линейка и т.п.). Постоянное нахождение биоиндикатора в среде своего обитания способствует изменению его внешних признаков при изменении качества самой среды, однако происходит это не сразу, а через определенное время, в течение которого биоиндикатор аккумулирует загрязняющие вещества (ЗВ), автоматически объединяя неблагоприятное воздействие всех ЗВ, находящихся в среде его обитания.

Автотрофные организмы, как известно, синтезируют органические вещества из неорганических, а гетеротрофы их потребляют. Растворенные в воде органические вещества служат питательным субстратом для очень большой группы организмов-гетеротрофов. Гетеротрофная форма жизни основана на метаболизме живыми существами только готовых органических соединений, ранее синтезированных другими живыми организмами. По мнению В.И. Попченко, в загрязненных нитритным и аммонийным азотом малых и средних озерах уровень биомассы зообентоса достигал десятков граммов на 1 м² [1]. Исследования Л.В. Шишинашвили и Б.А. Флерова доказывают, что с повышением концентрации указанных веществ в поверхностных водах (р. Дема, Шатское водохранилище и др.) до 100 ПДК уровень биомассы бентоса сокращался, т.е. приводил к экологическому регрессу [2].

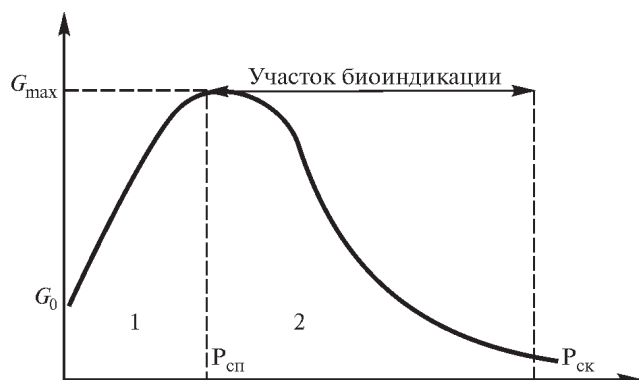
Значит, рост жизнеспособности биоиндикатора в загрязненной среде обитания ограничен толерантностью

(возможностью адаптироваться в загрязненной среде) биоиндикатора к индексу суммарного загрязнения среды обитания P_c . Справедливым оказывается утверждение, что при некотором пороговом значении индекса суммарного загрязнения среды $P_{сп}$ жизненность биоиндикатора достигает максимального значения G_{max} , уменьшаясь соответственно по мере возрастания загрязнения.

Максимальное значение жизненности биоиндикатора представляет собой норму, относительно которой можно оценивать степень регрессивной модификации (снижения жизненности) биоценоза как индикатора качества среды обитания.

Существуют два способа определения показателя максимальной жизненности биоиндикатора. Первый из них основан на экспериментальном анализе, осуществляемом на контрольном участке местности. Для этого на исследуемой территории выбирается участок, не подверженный воздействию экологически опасных факторов и максимально типичный по характеру ландшафта, растительности и почвы для выбранной изначально территории; этот участок местности и принимается в качестве контрольного. На нем определяются показатели качества окружающей среды, принимаемые за максимальные значения для данного района.

Второй способ опирается на известное в экологии правило А.В. Яблокова и Н.Ф. Реймерса [3] “11 процентов”: потеря экосистемой 11% своей структуры не влияет на ее жизнеспособность, потеря 50% структурных элементов существенно нарушает ее функционирование, а потеря 80% структурных элементов приводит к гибели. С учетом этого можно принять $G_{max} \geq 80\%$. В этом случае становится возможным соблюдение инвариантности математической модели биоиндикатора. Графическое изображение общей модели, отражающей функционирование биоиндика-



Функционирование биоиндикатора в загрязненной среде обитания, $G = f(P_c)$

G — жизненность биоиндикатора; G_0 — начальное состояние, G_{max} — максимальная величина; P_c — суммарное загрязнение среды обитания; $P_{сп}$ — пороговое значение индекса суммарного загрязнения среды; участок 1 — прирост жизненности биоиндикатора, участок 2 — регрессивная модификация биоиндикатора; $P_{ск}$ — критическое значение индекса суммарного загрязнения среды

тора в загрязненной среде обитания, представлено на рисунке, на котором видно, что в условиях загрязненной среды жизненность G растет от начального состояния G_0 и достигает максимальной величины G_{max} при пороговом значении $P_{сп}$ на участке 1.

Это участок прироста жизненности биоиндикатора, описывающий прогрессивную модификацию биоиндикатора за счет включения механизмов, препятствующих воздействию загрязненной среды. Дальнейший рост P_c сопровождается регрессивной модификацией биоиндикатора (участок 2), вплоть до критического значения $P_{ск}$, при котором достигается предел жизненности биоиндикатора. Изменение жизненности осуществляется в соответствии с диалектическим законом перехода количества в качество: из экологической “ниши”, обеспечивающей гармонию биоиндикатора с индексом загрязнения среды обитания, при дальнейшем росте загрязнения среды происходит переход на низшую экологическую “нишу”.

Регрессивная модификация сопровождается структурными изменениями биоиндикатора, которые можно наблюдать по внешним признакам (визуальная биоиндикация) или измерять инструментальными методами (инструментальная биоиндикация, или биотестирование). Эти изменения показывают, что стабильность развития организмов под воздействием антропогенного фактора нарушается.

Существует и другой метод оценки качества окружающей среды, основанный на оценке имманентной изменчивости морфологических структур биоиндикатора (например, степени выраженности флуктуирующей асимметрии) и анализе степени отклонения его развития от оптимального. Он является опытным и проводится в природных условиях [4].

С каждым годом все более актуальным становится изучение жизнедеятельности древесных растений в городских условиях. Вызвано это тем, что древесные растения, выполняющие важнейшие средообразующие и средозащитные функции (выделение кислорода и фитонцидов, ионизация воздуха, формирование своеобразного микроклимата), находясь на урбанизированных территориях, испытывают на себе постоянное отрицательное влияние техногенного загрязнения.

С 1997 г. на территории Москвы получил распространение такой метод оценки состояния экосистем, как мониторинг зеленых насаждений. Целями этого мониторинга стали:

- получение исходных данных для многокомпонентного корреляционного анализа состояния растений с учетом специфики площадки и совокупности воздействующих факторов;
- создание банка данных о состоянии зеленых насаждений в городе с учетом многообразия растительности, факторов воздействия, многовариантности мер по сохранению и защите зеленых насаждений;

— разработка рекомендаций по подбору ассортимента древесных и кустарниковых пород в зависимости от условий среды и видов негативного воздействия.

Оценка состояния зеленых насаждений производится по ряду параметров, наиболее важным среди которых является степень усыхания деревьев; использование этого параметра становится возможным, когда нарушения, произошедшие под влиянием неблагоприятных факторов, достаточно серьезны, а зачастую имеют необратимый характер. Однако современная экологическая наука настойчиво ищет дополнительные показатели для более тонкого контроля над состоянием растений, стремясь своевременно отреагировать на ухудшение ситуации и по возможности исправить ее.

При этом главной мишенью является гомеостаз — базовая характеристика, обеспечивающая нормальное состояние организма. Любая стрессовая ситуация приводит к изменению гомеостаза, поэтому методы оценки здоровья среды, основанные на характеристике гомеостаза организма, позволяют выявлять даже начальные изменения в состоянии живых существ и выступают как система раннего предупреждения.

Изменения гомеостаза, которые возникают под влиянием стрессовой ситуации, могут быть оценены по нарушению морфогенетических процессов (стабильности развития).

При таком подходе главным оказывается анализ стабильности развития, предполагающий рассмотрение процессов, которые снижают фенотипическое разнообразие, происходящее от нарушений в индивидуальном развитии. Снижение эффективности гомеостаза приводит к появлению отклонений от нормального строения различных морфологических признаков, обусловленных нарушениями развития. Последствия этих нарушений (в дополнение к обычно используемой для подобного анализа фиксации частоты существенных морфологических отклонений (фенодевиантов) как явных аномалий) могут быть оценены по значению показателей флуктуирующей асимметрии, в том числе и по незначительным отклонениям от совершенной билатеральной симметрии. Уровень таких морфологических отклонений от нормы оказывается минимальным лишь при определенных условиях, рассматриваемых как оптимальные, и неспецифично возрастает при любых стрессовых воздействиях.

Выявление флуктуирующей асимметрии может осуществляться на основе анализа разницы между количественными признаками (числом пятен, жилок, члеников, шипиков и др.) на сторонах биоиндикатора. Также для оценки уровня стабильности развития по системе морфологических признаков требуется использование интегральных показателей, среди которых основным является средняя частота асимметричного проявления.

Получение данных по различным природным популяциям дает возможность разработки балльной шкалы для оценки степени отклонения от нормы. Базовыми принципами для построения пятибалльной системы становятся следующие:

— диапазон значения показателя, соответствующий условно-нормальному, фоновому состоянию, принимается как первый балл;

— диапазон значений, соответствующий критическому состоянию, принимается за пятый балл;

— весь диапазон значений между этими пороговыми уровнями ранжируется в порядке возрастания значений.

Суммирование данных по ряду независимых признаков в этом случае приводит к получению в действительности интегральной оценки ситуации для сравнения различных территорий и видов. Таким образом, подобный анализ изменений состояния организма дает возможность балльной оценки этого состояния по уровню развития.

И хотя данная система оценивания опирается на анализ различных видов растений, получаемые выводы применимы для характеристики благоприятности среды и для человека.

Кроме оценки степени отклонения от нормы исследуемого объекта принципиальное значение в этом отношении имеет также получение экспресс-информации о состоянии клеток организмов в результате различных внешних воздействий — информации, которая уже на ранних этапах позволила бы диагностировать изменение клеточного метаболизма под влиянием внешних факторов. Особенно важно владеть этой информацией задолго до того, как результат внешних воздействий на организмы проявится в видимых признаках, таких, как задержка роста и изменение формы клеток, уменьшение численности клеточной популяции и общей биомассы, характеризующих состояние и отдельных звеньев, и экосистемы в целом. Для оперативного получения информации о состоянии клеток организма используются различные современные биологические (в том числе и биофизические) методы экспресс-диагностики, основанные на регистрации начальных нарушений клеточного метаболизма, в первую очередь на молекулярном и мембранном уровнях организации клетки.

В последнее время все более популярными становятся различные спектральные и люминесцентные методы. Основой такого подхода является способность хлорофилла и ферментов типа пероксидаз, находящихся в клеточных мембранах или цитоплазме, служить своего рода природными датчиками состояния живых клеток водорослей и высших растений. Неблагоприятное состояние окружающей среды приводит к изменениям в процессе переноса электронов, что в свою очередь ведет к повреждению фотосинтетических мембран. В результате данного повреждения происходят изменения оптических свойств хлорофил-

ла, что и позволяет своевременно диагностировать состояние клеток [5].

Несомненно, эти методы экологического мониторинга будут широко использоваться в будущем, поскольку они обеспечивают раннюю экспресс-диагностику состояния клеток в природных условиях.

Спектральные методы в экологических исследованиях применяются уже давно. Известно, например, что изменение оптических свойств растительного покрова, фиксируемых с помощью искусственных спутников Земли, показывает состояние растительных массивов. В частности, длительная засоленность почв, засуха, обезвоживание приводят к характерным изменениям спектров поглощения хлорофилла листового покрова и позволяют сделать вывод о неблагоприятном состоянии растений. Но эти эффекты наблюдаются через значительные промежутки времени, когда нарушения уже произошли и стали, как правило, необратимыми.

Флуориметрические методы, напротив, отражают такие изменения в фотосинтетическом аппарате, которые происходят на самых начальных этапах внешнего воздействия. Дело в том, что первичные стадии фотосинтеза под воздействием внешней среды активно регулируются клеткой в соответствии с ее физиологическим состоянием. Целью этой регуляции является оптимальное сопряжение световых и темновых стадий фотосинтеза, необходимое для поддержания определенного уровня метаболизма в измененных внешних условиях.

Совокупность первичных процессов фотосинтеза (ППФ) — это целостная система, характеризующаяся структурно-функциональной автономией и обладающая собственными механизмами регуляции.

В основе молекулярных механизмов ППФ лежат электронно-конформационные взаимодействия, которые обеспечивают направленные изменения конфигурации переносчиков при приеме или отдаче электрона. Такого рода структурные изменения регулируют эффективность превращения энергии в фотосинтезе. Резкие изменения условий среды или другие неблагоприятные воздействия могут нарушить сопряжение последовательных стадий переноса электрона, в результате чего возникнет избыток электронов или энергии электронного возбуждения на отдельных участках цепи. Это в свою очередь может привести к появлению активных форм кислорода и как следствие — к окислительному повреждению мембраны.

Различные изменения характера ППФ влияют на спектральные свойства (поглощение, флуоресценция пигментов) взаимодействующих переносчиков. Таким образом, флуоресценция хлорофилла является обобщенным интегральным параметром, который позволяет оценить эффективность и динамику начальных стадий трансформации энергии.

Результаты фундаментальных исследований в этой области могут использоваться в области прикладной

биотехнологии и экологии, например при разработке флуориметрических индикаторов физиологического состояния растений.

Одними из наиболее распространенных методов, позволяющих контролировать состояние основных функциональных систем организмов, являются биolumинесцентные методы [6]. Их используют для оценки степени токсичности воды в полевых условиях, а также почвы и атмосферного воздуха в лабораторных условиях путем приготовления водных экстрактов.

Оценка биolumинесценции в большинстве случаев осуществляется с помощью тест-системы “Эколюм”, которая была разработана в лаборатории антибиотиков кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. К достоинствам данного метода относят быстрое действие (одна проба анализируется в течение 1–5 мин) и хорошую воспроизводимость результатов (погрешность метода не более 5%). Тест-система “Эколюм” включает в себя комплект специальных реагентов (биосенсоров), которые создаются на основе морских гетеротрофных люминесцентных бактерий, культивируемых в лабораторных условиях, а также специально разработанные для этой системы люменометры. Люменометр подключается к компьютеру и сопровождается специальной программой, которая позволяет непрерывно обрабатывать и фиксировать измерения, выводить результаты на экран компьютера, печатать и сохранять их.

Принцип работы люменометра “Биотокс” основан на регистрации слабых световых потоков биосенсора “Эколюм” с помощью фотоэлектронного фотоумножителя, работающего в режиме счета анодных импульсов. Биосенсор “Эколюм” представляет собой лиофилизированные культуры люминесцентных бактерий, содержащиеся в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах.

Портативный прибор “Биотокс-10” может в автоматическом режиме осуществлять определение интенсивности биolumинесценции тест-объекта, индекса токсичности пробы, усредненной величины индекса токсичности, вычисление стандартного отклонения показателя токсичности, исследование динамики процесса взаимодействия токсикантов с тест-объектом, компьютерную обработку данных, а наличие звукового сигнала говорит о превышении пробой допустимого уровня токсичности.

Выводы

Анализ вышеперечисленных методов биодиагностики состояния окружающей среды показывает, что их сочетание и применение на практике дают наиболее достоверную оценку ее состояния, а также при проведении исследований в районах с разной антропогенной нагрузкой позволяют определить степень и характер воздействия ряда поллютантов на исследуемые объекты. Повышение эффективности системы экологического мониторинга возможно путем

рационального сочетания малозатратных методов биодиагностики качества окружающей среды, о которых

было сказано выше, с методами дифференциальной диагностики загрязняющих веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попченко В.И. Экологические модификации сообществ бентоса в условиях загрязнения водных экосистем // Экологические модификации и критерии экологического нормирования: Тр. Междунар. симпоз. Л., 1991.
2. Шишинашвили Л.В., Флеров Б.А. Токсикологические аспекты экологических модификаций // Экологические модификации и критерии экологического нормирования: Тр. междунар. симпоз. Л., 1991.
3. Реймерс Н.Ф., Яблоков А.В. Словарь терминов и понятий, связанных с охраной живой природы. М.: Наука, 1982.
4. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Чубинишвили А.Т. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000.
5. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. № 4.
6. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / Под ред. О.П. Мелеховой, Е.И. Егоровой. М.: Академия, 2007.

Поступила в редакцию
23.01.13

BIOLOGICAL METHODS OF ECOLOGICAL DIAGNOSTICS AS THE QUALITATIVE ASSESSMENT OF THE ENVIRONMENT POLLUTION

A.S. Kholoimova

Existing methods for environment quality assessment do not meet current requirements as comparison of the quantity indexes of pollution with maximum allowable concentration (MAC) lies in the basis. This degrades significantly the authenticity of the achieved results. Biological methods of ecological diagnostics become priority-oriented as they give the qualitative assessment of the environment and rely on examination of pollutant response of living organisms.

Key words: *ecological diagnostics, bioindication, integral criterion of environmental quality.*

Сведения об авторе

Холоимова Александра Сергеевна — инженер кафедры физического воспитания и спорта МГУ.
Тел.: 8-499-127-89-40; e-mail: holoimova_alex@mail.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК 579

**ВОЗМОЖНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ОТХОДОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ****А.Е. Соловченко, А.А. Лукьянов, С.Г. Васильева, Я.В. Саванина,
О.В. Соловченко, Е.С. Лобакова***(кафедра биоинженерии; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru)*

Обзор посвящен новой методологии биологической очистки и глубокой переработки отходов животноводческих ферм (навоза, помета, сточных вод) с использованием интенсивной культуры фототрофных микроорганизмов (микроводорослей, МВ). Рассматриваются критерии выбора МВ и особенности их культивирования для эффективного изъятия биогенных элементов и деструкции органических компонентов животноводческих отходов, варианты утилизации полученной биомассы МВ (например, для производства кормовых добавок и удобрений) с целью повышения рентабельности переработки отходов. Приводится анализ преимуществ и недостатков нового метода по сравнению с традиционными анаэробными технологиями. Особое внимание уделяется интегрированным технологиям, сочетающим традиционные методы анаэробной переработки и доочистку с применением МВ.

Ключевые слова: анаэробная переработка, биоизъятие, микроводоросли (МВ), фотобиореактор (ФБР), фотосинтетическая аэрация.

Безопасная утилизация жидкого навоза, помета и сточных вод, поступающих от производственных зон содержания и выращивания скота и птицы, а также из перерабатывающих цехов (далее — отходы животноводства), — актуальная проблема, сдерживающая развитие сельскохозяйственного производства. В последнее время эта проблема особенно обострилась вследствие массового строительства крупных животноводческих и птицеводческих комплексов, вызванного интенсификацией сельскохозяйственного производства и перевода его на промышленную основу. Стоки животноводства отличаются высокой концентрацией органических веществ и биогенных минеральных элементов, прежде всего аммонийного и нитратного азота (N), фосфора (P), и высокой санитарно-эпидемиологической опасностью; сброс этих стоков без надлежащей очистки и обеззараживания запрещен, поскольку приводит к эвтрофикации и заражению водоемов и почв болезнетворными микроорганизмами [1—4].

Менее половины связанного азота из состава кормов в итоге усваивается животными, остальное попадает в отходы — навоз и помет. Согласно действующим нормам сельскохозяйственные стоки после химического или термического обеззараживания вносятся на поля, использование биологической очистки допускается в исключительных случаях [3]. Традиционно для биологической очистки отходов животноводства используют многоступенчатые биологические пруды, включающие аэробные водорослевые

пруды (2-я ступень), песчано-гравийные фильтры, биофильтры и аэротенки [3]. В качестве альтернативных решений предлагаются гидропонные и комбинированные методы с использованием биоплато, засаженных высшими водными растениями, и террас с многолетними травами, а также земледельческие поля орошения. Однако эти методы сложны в реализации, неэффективны в холодное время года и требуют больших площадей. Во многих случаях оставляет желать лучшего и эффективность (скорость и полнота) очистки. Как следствие далеко не все хозяйства обладают очистными сооружениями надлежащего устройства, а существующие сооружения нередко эксплуатируются с нарушениями технологического режима. Вышеперечисленные проблемы обусловили потребность в разработке альтернативных, более эффективных технологий, к которым относится биологическая очистка с помощью МВ.

Методология использования фотосинтезирующих микроорганизмов для очистки сточных вод разрабатывается уже более полувека [5], но исследования в области глубокой переработки отходов и очистки стоков животноводства с применением интенсивных культур фотоавтотрофных микроорганизмов МВ в закрытых системах (фотобиореакторах, ФБР) стали проводиться относительно недавно. Данные технологии обладают рядом преимуществ. Так, МВ присуща высокая скорость роста и поглощения биогенных элементов [6]. При этом МВ обеспечивают так называемую фотосинтетическую аэрацию, выделяя в результате фотосинтеза кислород, эффективно окисляя

ющий органические молекулы и поддерживающий рост гетеротрофных бактерий, также интенсивно утилизирующих органические компоненты отходов [7]. Кроме того, снижаются затраты энергии на очистку, поскольку частично либо полностью устраняется потребность в аэрации и механическом перемешивании [8]. Очистка с применением МВ в целом более экологична, так как не генерирует вторичных отходов, таких как отработанный активный ил, нуждающихся в утилизации.

Отдельного упоминания заслуживает способность МВ к синтезу широкого спектра ценных соединений. К ним относятся липиды, содержащие незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты, включая арахидоновую [9], γ -линоленовую [10], эйкозапентаеновую и др. [11, 12], а также каротиноиды с витаминной и антиоксидантной активностью, такие как астаксантин [13] и β -каротин [14]. Обогащенная липидами и (или) углеводами биомасса МВ, в том числе полученная при культивировании на стоках [15], также может быть переработана в различные виды биотоплива, такие как биодизель, метан, биоводород и др. [16]. Таким образом, использование МВ обеспечивает более глубокую переработку отходов животноводства с попутным получением продуктов с более высокой добавленной стоимостью.

Благодаря многочисленным преимуществам биологическая очистка с применением МВ представляется одной из наиболее перспективных биотехнологий для очистки сточных вод [6, 15, 17], в том числе стоков и отходов животноводства. Она характеризуется потенциально высокой эффективностью очистки от загрязнений, простотой эксплуатации и экономичностью, позволяет утилизировать сточные воды с минимальным ущербом для окружающей среды и дает дополнительную выгоду — попутное получение ценной биомассы МВ и в потенциале полную утилизацию отходов. Однако данный подход пока еще не получил распространения в России из-за недостаточной разработки методов интенсивного культивирования МВ, в том числе в ФБР, и отсутствия практического опыта проектирования сооружений для очистки животноводческих стоков с использованием интенсивных культур МВ. За рубежом исследования и разработки в этой области идут возрастающими темпами. В связи с вышесказанным настоящий обзор посвящен анализу возможностей применения современных разработок в области биотехнологии микроводорослей для глубокой переработки отходов и очистки стоков животноводческих предприятий с попутным получением биомассы МВ и биопродуктов из нее.

Изъятие биогенных элементов микроводорослями

Эффективность преобразования азота (N) кормов в пищевую продукцию скота и птицы не превышает 40% от общего N из состава кормов, соответственно

более 60% N попадает в отходы [18]. Вместе с тем связанный N и фосфор (P) необходимы для роста растений и МВ. Следует также учитывать, что в чрезмерных концентрациях связанный N является серьезным загрязнителем, вызывающим эвтрофикацию: нарушение кислородного режима водоемов, “цветение” токсичных МВ и потерю биоразнообразия [19]. Однако высокая степень обогащения питательными элементами позволяет добавлять отходы животноводства в среды для культивирования МВ и даже использовать их после разбавления в качестве сред. Виды и штаммы МВ, демонстрирующие быстрый рост на стоках, обогащенных N и P [17], используются для эффективного изъятия биогенных элементов из стоков (деэвтрофикация).

На химический синтез азотных и фосфорных удобрений тратится огромное количество энергии, это производство наносит значительный вред окружающей среде [20]. В этой связи важно, что, в отличие от традиционных систем биологической очистки, в которых бактерии-денитрификаторы превращают связанный азот в N_2 , который улетучивается в атмосферу, клетки МВ усваивают аммонийный и нитратный N, включая его в состав своих клеток. Так удается возвращать связанный N в агроэкосистемы, например в виде удобрений, полученных из биомассы МВ [2].

Фосфор необходим для роста растений, доступность P в почвах, как правило, лимитирует рост растений. Фосфатные удобрения являются одной из основ интенсивного сельского хозяйства. Однако растения усваивают не более 20% растворимого P, вносимого в почву с удобрениями, остальное обычно выносится с грунтовыми водами и стоками с полей в реки. В итоге суспендированные и растворенные фосфаты оказываются в море, где частично усваиваются фитопланктоном, но большая часть P безвозвратно теряется [21]. Следует также заметить, что запасы минералов для производства фосфорных удобрений стремительно сокращаются, к 2033 г. ожидается возникновение дефицита фосфатов [22]. Избыток P, подобно избытку N, приводит к эвтрофикации и нарушению водных экосистем, в которые попадают богатые биогенными элементами стоки [21]. Традиционно используется химическое осаждение P с последующей конверсией осадка в активированный ил с использованием микроорганизмов [23]. Однако осажженный данным методом P не удается в полной мере повторно использовать, поэтому активный ил с P-содержащим осадком захоранивают либо перерабатывают в удобрение. В этой связи весьма актуальна проблема изъятия P из сточных вод и возврата его в агроэкосистемы. Существенно, что МВ эффективно утилизируют P (хотя менее эффективно по сравнению с N), в то время как в традиционных системах очистки сельскохозяйственных стоков устранение избытка фосфатов доставляет особые трудности. В зависимости

от используемой технологии культивирования и нагрузки степень изъятия Р с помощью МВ достигает 50—70% [1].

Окисление органических компонентов и обеззараживание отходов

Одним из важных процессов в традиционной технологии переработки является компостирование и сбраживание, в ходе которого происходит разогрев и обеззараживание навоза и помета. При переработке с использованием МВ те же цели достигаются иными средствами: интенсивный рост МВ сопровождается повышением рН среды вследствие совместного поглощения ионов H^+ и NO_3^- . В сочетании с фотосинтетической аэрацией (повышающей содержание кислорода в среде) этот фактор приводит к значительному снижению содержания в среде патогенных бактерий [5, 7].

Интенсивная аэрация очистных сооружений при использовании аэробных технологий — неременное условие эффективной очистки, поскольку она обеспечивает поступление кислорода, необходимого для окисления органических компонентов загрязнения (снижение величин БПК и ХПК). В традиционных системах используется механическая (за счет перемешивания) либо пневматическая (за счет барботирования атмосферным воздухом) аэрация [18]. При использовании МВ потребность в кислороде, как правило, полностью покрывается за счет выделения кислорода фотосинтезирующими клетками МВ, дополнительная аэрация при этом не требуется. Более того, фотосинтетическая аэрация более эффективна, поскольку насыщение стоков кислородом в ходе жизнедеятельности МВ идет намного эффективнее, чем при обычном барботировании. Таким образом, принудительная аэрация в данном случае необходима лишь для более полного перемешивания культуры (см. ниже).

Получение и отбор микроводорослей для очистки сельскохозяйственных стоков

Эффективность изъятия биогенных элементов МВ во многом определяется скоростью их роста [24], поэтому особого внимания в контексте очистки животноводческих стоков заслуживают быстрорастущие штаммы МВ. Не менее важны такие характеристики, как способность к миксотрофному росту, толерантность к неблагоприятным факторам, высокая скорость оседания клеток, содержание ценных веществ в биомассе. Многими исследователями показано, что одноклеточные зеленые водоросли (Chlorophyta) обладают наивысшей среди изученных МВ толерантностью к условиям культивирования на эвтрофных сточных водах [25, 26]. Так, типичными доминантами планктонной альгофлоры окислительных прудов являются представители родов *Chlorella* и *Scenedesmus* [27, 28].

В отдельных системах эффективного изъятия биогенных элементов удавалось добиться и с помощью цианобактерий [29].

Следует отметить, что даже в пределах одного рода наблюдается существенная гетерогенность по толерантности к высоким концентрациям N, P и органических компонентов стоков. Так, в одном из исследований *Chlorella vulgaris* оказалась более эффективной, чем *Chlorella kessleri* [30], в другом случае *Scenedesmus obliquus* показал лучшие результаты по сравнению с *C. vulgaris* [26]. Ожидаемой высокой эффективностью в плане очистки стоков обладают изоляты МВ, выделенные в местах сброса. Эффективные продуценты липидов и углеводов, такие как *Botriococcus braunii*, также продемонстрировали хороший рост на животноводческих стоках с высоким содержанием нитратного азота [31].

При отборе штаммов-кандидатов для использования в системах очистки животноводческих стоков с помощью интенсивных культур МВ имеет смысл провести предварительное тестирование толерантности к конкретным стокам и выработку адаптации путем перевода отобранных штаммов на среды, содержащие реальные постепенно возрастающие пропорции реальных стоков, которые предполагается очищать. Для предварительной селекции и (или) адаптации МВ также используют модельные среды, имитирующие по составу стоки. Однако подобные испытания должны проводиться с учетом заведомо более низкой токсичности искусственных стоков.

Перспективным подходом является выделение МВ из автохтонной альгофлоры лагун и площадок для компостирования, поскольку в этих местах преобладают виды, толерантные к эвтрофным условиям и адаптированные к росту на отходах животноводства. Таким способом удастся получить штаммы, более эффективные по сравнению с МВ из других местообитаний, адаптированными к росту на сточных водах [32].

Поиск оптимальных условий культивирования

Световой режим

Для МВ, выращиваемых в ФБР в условиях интенсивного культивирования, освещенность обычно является лимитирующим фактором, поскольку из-за высокой численности клеток и сильного поглощения светового излучения пигментами лишь клетки, находящиеся в тонком поверхностном слое культуры (> 10 мм), получают достаточное для фотосинтеза количество света [33]. Тем не менее для эффективной очистки животноводческих стоков протекание фотосинтеза с достаточной скоростью имеет первостепенное значение, поскольку от него зависит накопление биомассы, потребление биогенных элементов и фотосинтетическая аэрация. Обеспечить световой энергией клетки МВ в культуре высокой плотности (> 1 г/л сухой биомассы МВ) простым на-

ращиванием освещенности невозможно. Причина в том, что на свету высокой интенсивности клетки, расположенные близко к поверхности культивационного сосуда ФБР, получают избыточное количество света, вызывающее фотоокислительное повреждение и даже гибель МВ, тогда как клетки в более глубоких слоях культуры по-прежнему испытывают недостаток света [33, 34].

Для достижения равномерного облучения клеток культуры используют различные стратегии. Первая ориентирована на использование плоских либо трубчатых ФБР с толщиной (или диаметром) светопрозрачных культивационных сосудов, близкой к толщине фотического слоя (т.е. слоя, в котором клетки МВ получают достаточное для фотосинтеза количество световой энергии). Однако при малой толщине плоские сосуды большого объема неудобны в эксплуатации из-за большой площади и низкой прочности.

Другая стратегия основана на интенсивном перемешивании культуры. При этом оптимальной будет такая скорость перемешивания, при которой клетки МВ проводят в фотическом слое столько времени, сколько необходимо для улавливания достаточного количества световой энергии. В остальное время в клетках (пребывающих вне фотического слоя, фактически в темноте) протекают темновые реакции фотосинтеза, в которых утилизируются синтезированные за время пребывания на свету молекулы АТФ и восстановительных эквивалентов [35]. В такой ситуации удастся достичь более высокой плотности культуры при большей интенсивности света без риска фотоповреждения клеток МВ [36]. Соответственно ФБР, поддерживающие культивирование МВ при большей плотности культуры, обеспечивают большую продуктивность при очистке при равной нагрузке на биомассу МВ.

Третья стратегия основана на использовании периодического освещения [37, 38]. При этом длина и интенсивность вспышек света, а также длительность интервалов между ними подбирается с учетом тех же факторов — времени, необходимого клеткам МВ на поглощение достаточного для фотосинтеза количества световой энергии, и времени, необходимого для ее утилизации. Следует заметить, что данная задача в силу своей сложности не получила до настоящего времени аналитического решения [35].

Источники света для культивирования МВ

Осветители для культивирования МВ должны испускать максимум энергии в видимой области спектра (в области фотосинтетически активной радиации, ФАР; 400–700 нм). Традиционные лампы накаливания, в том числе галогенные, пригодны для целей освещения культур, но наряду с видимым светом испускают довольно много теплового (инфракрасного, ИК) излучения, которое не используется для фотосинтеза, но может приводить к излишнему

нагреву ФБР. Более удобны люминесцентные лампы дневного света, поскольку они дают равномерное освещение, имеют гладкий спектр излучения, содержащий минимум ИК-излучения, и характеризуются большей по сравнению с лампами накаливания энергоэффективностью.

Благодаря значительному прогрессу в конструировании твердотельных источников света в последнее время появились доступные светоизлучающие диоды (СИД), обладающие высокими характеристиками в плане светоотдачи, энергоэффективности, спектрального качества излучения и долговечности [39, 40]. По-видимому, именно источники света на основе СИД являются в настоящее время наиболее перспективными для использования в ФБР [18, 41], проектируемых для решения задачи очистки сточных вод.

Метод и скорость перемешивания

Как отмечено выше, перемешивание культуры является важным фактором ее роста и как следствие — эффективности очистки. Перемешивание ускоряет перенос масс в ФБР, способствуя равномерному распределению питательных веществ в объеме культуры, аэрации и освещению клеток МВ (см. выше), а также препятствует оседанию клеток в суспензионных культурах [42]. В настоящее время используют главным образом механическое или пневматическое (эрлифт, airlift) перемешивание [43]. Механическое перемешивание обычно осуществляется с помощью подвижных лопаток, крыльчаток и колес с лопастями. Для пневматического перемешивания в культивационных сосудах монтируются форсунки, подающие атмосферный воздух или газо-воздушную смесь из атмосферного воздуха и CO₂. Чем выше скорость перемешивания, тем интенсивнее происходит перенос масс в культуре, что благоприятно с точки зрения скорости роста культуры, утилизации биогенных элементов и деструкции органических загрязнителей. Однако при определенных скоростях потока возникают так называемые сдвиговые деформации (shear stress), которые негативно влияют на физиологическое состояние МВ и могут приводить к разрушению клеток. В силу этого обстоятельства скорость перемешивания приходится ограничивать, и нередко данный фактор становится лимитирующим для эффективности работы ФБР и скорости очистки [44].

Температура

Подобно освещенности, температура имеет ключевое значение для роста и продуктивности; характер этой зависимости во многом определяется видовыми особенностями и иными условиями культивирования [33]. При оптимальных и близких к оптимальным для роста температурам наблюдается наиболее интенсивное изъятие N и P из среды культивирования. В большинстве случаев для роста МВ оптима-

лен диапазон 20—30°C. Температура также оказывает сильное влияние на жирнокислотный состав биомассы МВ: снижение температуры приводит к снижению ненасыщенности жирных кислот структурных липидов мембран клеток МВ [33, 45].

Нагрузка на биомассу и начальная плотность культуры

Подбор адекватной начальной плотности культуры (по числу клеток или количеству хлорофилла на единицу объема инокулюма) — один из ключевых факторов успеха культивирования МВ на сточных водах, включая стоки животноводства [46]. Слишком низкая начальная плотность (чрезмерная нагрузка) приводит к сильному замедлению роста культуры и даже к ее гибели. При чрезмерной концентрации биогенных элементов и (или) органических компонентов стоки приходится разбавлять; оптимальным представляется использование для разбавления менее концентрированных стоков с той же фермы.

От удельной скорости поступления загрязнителей в очистное сооружение с культурой МВ (от величины нагрузки по N, P, ХПК и пр.) зависят скорость и полнота изъятия биогенных элементов. В общем случае чем больше плотность культуры (меньше нагрузка), тем быстрее происходит извлечение биогенных элементов и деструкция органических компонентов сточных вод [47]. Так, по данным Mulbry с соавт. [1], эффективность очистки животноводческих стоков от биогенных элементов с использованием МВ достигает 70—90% при поступлении в N и P со скоростью не более 1 и 0,15 г/м²/сут соответственно; повышение скорости поступления биогенных элементов приводит к падению полноты их изъятия до 50—80%.

Таким образом, при разработке технологий биологической очистки животноводческих стоков с помощью МВ критически важно установить значения оптимальной и предельной нагрузки на биомассу. При этом следует учитывать, что эти значения будут различными для разных компонентов сточных вод в зависимости от обилия и токсичности последних. Так, высокое содержание аммонийного N может ингибировать рост МВ [48—50]. Соответственно скорость биологической очистки стоков при прочих равных будет лимитироваться компонентом, для которого значение оптимальной нагрузки является минимальным.

Барботирование культур

Основной положительный эффект барботирования в случае культивирования МВ для очистки животноводческих стоков заключается в перемешивании культуры (см. раздел “Метод и скорость перемешивания”). В традиционной интенсивной культуре МВ барботирование служит, среди прочего, для снижения концентрации растворенного в среде кис-

лорода. При очистке выделяемый клетками в процессе фотосинтеза кислород интенсивно расходуется на окисление органических компонентов стоков, поэтому при достаточной нагрузке его концентрация в ФБР не повышается до значений, вызывающих ингибирование роста МВ.

Атмосферная концентрация CO₂ является лимитирующей для роста МВ, поэтому барботирование культур смесью воздуха с CO₂ позволяет в общем случае повысить скорость роста культуры МВ [6, 15, 51], в системах для очистки животноводческих стоков данный эффект наблюдается не всегда [22]. Вероятная причина заключается в дополнительном поступлении CO₂ вследствие дыхания сопутствующих гетеротрофных бактерий. Тем не менее можно думать, что при использовании МВ, толерантных к высоким концентрациям CO₂, насыщение культуры углекислым газом, вероятно, позволит увеличить скорость накопления биомассы и эффективность изъятия биогенных элементов. Для этой цели было бы оптимальным барботирование дымовыми газами котельных (после отделения твердых частиц и кислотных ангидридов), обогревающих фермы (концентрация CO₂ в дымовых газах — около 20%). Однако влияние высоких (> 10%) концентраций CO₂ на рост МВ в эвтрофных условиях, по нашим сведениям, не исследовалось.

Фотобиореакторы для суспензионных культур

В настоящее время больше всего МВ используются для очистки сточных вод в традиционных стабилизационных (окислительных) прудах, а также в более высокотехнологичных интенсивных водорослевых прудах (HRAP), в которых применяется принудительное механическое перемешивание [7, 17, 31, 52]. Существенным недостатком подобных систем является зависимость степени и скорости очистки от погодных условий (низкая эффективность в холодное время года, высокая потеря воды вследствие испарения), нестабильный выход и качество биомассы и контаминация [53]. Кроме того, подобные очистные сооружения занимают много земли, цена на которую постоянно растет.

Закрытым системам для выращивания суспензионных культур МВ, к которым относятся и ФБР, эти проблемы присущи в меньшей степени [54]. Наиболее распространенными являются вертикальные и горизонтальные трубчатые, кольцевые и плоскочастотные ФБР. Поскольку детальный анализ преимуществ и недостатков различных вариантов ФБР можно найти в обзорах [55—57], в настоящей статье этот предмет в деталях не рассматривается.

Иммобилизованные микроводоросли

Альтернативным способом биологической очистки сточных вод микроводорослями является использование иммобилизованных культур. Данный спо-

соб характеризуется рядом преимуществ, включая высокую скорость роста МВ, высокую эффективность очистки и незначительный вынос клеток из ФБР с током культуральной среды [58]. Иммобилизация МВ может достигаться путем их включения в альгинатные гели [8], а также путем формирования биопленок [59]. Показано, что клетки *C. vulgaris*, иммобилизованные в альгинатных гранулах, способны изымать из сточных вод до 80% аммония и 70% фосфора [30]. Клетки *Scenedesmus*, иммобилизованные в альгинатных листах, так же эффективно изымают биогенные элементы из сточных вод после вторичной (аэробной) очистки [60].

Основная сложность при использовании иммобилизованных МВ заключается в выборе способа иммобилизации и сбора биомассы. Для очистки животноводческих стоков применяются торфяно-водорослевые скрубберы (algal-turf scrubbers, ATS). Эти системы способны функционировать с нагрузкой порядка 2700 кг N и 400 кг P на 1 га в год, позволяя получать за тот же период до 27 000 кг/га сухой биомассы МВ, пригодной для производства кормовых добавок [22]. Существенно, что стоимость очистки животноводческих стоков данным способом ниже по сравнению с традиционными способами (11 долл. США/кг N, изъятого из сточных вод).

Сбор биомассы и подготовка ее к переработке

Одна из наиболее сложных проблем при разработке биотехнологий для очистки сточных вод при помощи МВ связана со сбором биомассы и подготовкой ее к дальнейшей переработке. Оседание клеток МВ под действием гравитации, как правило, происходит недостаточно быстро и полно. По оценкам экспертов, именно отсутствие простых и недорогих методов сбора биомассы во многом сдерживает распространение технологий очистки сточных вод с использованием МВ [58]. Следует заметить, что задача сбора биомассы упрощается при использовании иммобилизованных на пластиковых подложках культур МВ (см. выше).

Наиболее распространенными методами сбора биомассы являются фильтрация, центрифугирование и флокуляция (биофлокуляция), а также различные комбинации этих методов [15, 41, 51]. Центрифугирование удобно тем, что позволяет быстро отделить от среды более 95% клеток практически любого вида МВ, недостаток этого метода — высокая стоимость вследствие большого энергопотребления.

Метод флокуляции основан на использовании реагентов, компенсирующих отрицательные заряды на поверхности клеток МВ, в норме не позволяющие клеткам слипаться. Добавление к культуре таких веществ, как FeCl_3 или $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (последний реагент особенно часто применяют при очистки сточных вод), устраняет поверхностный заряд [61]. Альтернативные

флокулирующие агенты включают щелочи и полимерные катионы, такие как хитозан [62]. Клетки отдельных видов МВ, например *C. minutissima*, приобретают способность к флокуляции в определенных условиях либо на поздних стадиях культивирования без добавления специальных реагентов (это явление было названо биофлокуляцией). В результате флокуляции формируются агрегаты клеток, которые легко отфильтровать или осадить центрифугированием при низкой скорости, однако при очистке сточных вод чаще используется осаждение под действием гравитации, поскольку приходится отделять большие количества биомассы для переработки в продукты с низкой добавленной стоимостью [61].

Для сбора биомассы также может использоваться фильтрация под давлением или вакуумом. В качестве фильтра может применяться инфузорная земля и целлюлозные волокна, однако такие фильтры не подходят для видов с мелкими клетками, такими как *Chlorella*. В последнем случае приходится использовать мембранные фильтры, требующие частой замены [51]. С учетом расхода энергии на создание давления или вакуума разница по стоимости между фильтрацией и центрифугированием получается минимальной, и центрифугирование остается предпочтительным методом [63].

Использование иммобилизованных культур (см. выше) существенно упрощает задачу сбора биомассы, к тому же этот метод более удобен для очистки сточных вод. В этой связи были разработаны различные способы иммобилизации, сравнительный анализ их эффективности при очистке воды приводится в обзорах [8, 58]. Дальнейшая переработка иммобилизованной таким образом биомассы МВ может осуществляться путем термохимической конверсии (пиролиза) или сбраживанием с получением биоэтанола. Пока неясно, возможна ли эффективная экстракция из иммобилизованной биомассы липидов для производства биодизеля.

Утилизация биомассы микроводорослей

Производство биотоплива

Одним из перспективных способов переработки биомассы МВ является производство биотоплива [17]. В зависимости от технологии переработки возможно производство твердого (пеллеты из сухой биомассы), жидкого (биодизель и углеводородные продукты пиролиза) или газообразного (биогаз, полученный путем анаэробного сбраживания биомассы) топлива. По оценкам экспертов, распространение должно получить именно биотопливо, полученное из биомассы МВ, выращенных на сточных водах, поскольку только оно способно конкурировать с ископаемым топливом при текущем уровне цен на нефть [15, 17]. Получение биомассы, пригодной для производства биодизеля, явилось целью большинства

**Продуктивность по биомассе и по липидам микроводорослей,
культивируемых на животноводческих стоках (по [17] с изменениями)**

Тип сточных вод	Вид водоросли	Продуктивность по биомассе (сухой вес)	Содержание липидов, % сухого веса	Продуктивность по липидам	Источник
Свиной навоз с высоким содержанием NO_3^-	<i>Botryococcus braunii</i>	700 мг/л/сут	—	69 мг/л/сут	[69]
Коровий навоз на пенопластовой подложке	<i>Chlorella</i> sp.	2,6 г/м ² /сут	9	230 мг/м ² /сут	[70]
Стоки свиноферм (после сбраживания)	<i>Scenedesmus</i> sp.	6 мг/л/сут	0,9	0,54 мг/л/сут	[71]
Стоки свиноферм, макс. нагрузка	<i>R. hieroglyphicum</i>	10,7 г/м ² /сут	0,7	72 мг/м ² /сут	[22]
Стоки молочных ферм, аэрация с CO_2	<i>R. hieroglyphicum</i>	17,9 г/м ² /сут	1,2	210 мг/м ² /сут	[72]
Коровий навоз, 25-процентное разведение	Консорциум <i>Chlorella</i> sp., <i>Micractinium</i> sp., <i>Actinastrum</i> sp.	59 мг/л/сут	29	17 мг/л/сут	[73]

работ по культивированию МВ на животноводческих стоках (таблица). Однако следует учитывать, что культивирование МВ в эвтрофных условиях не вызывает индукции синтеза запасных липидов, характерной для МВ, культивируемых при дефиците N в среде [64]. В силу этого обстоятельства при использовании сточных вод с высоким содержанием биогенных элементов сложно получить биомассу с содержанием липидов больше 20%. По-видимому, полученная в подобных условиях биомасса МВ больше подходит для анаэробной переработки с целью получения биогаза, а также для производства кормовых добавок и удобрений.

Производство кормовых добавок

В сущности при культивировании МВ на животноводческих стоках их рост не лимитирован по N. В составе жирных кислот липидов клеток МВ в этих условиях преобладают моно- и полиненасыщенные ЖК семейств C16 и C18 [22]. При использовании иммобилизованных МВ данный эффект прослеживался независимо от скорости подачи стоков в ФБР [22].

Для технологий, ориентированных на производство кормовых добавок, предпочтительнее культивирования видов МВ, накапливающих незаменимые длинноцепочечные жирные кислоты в липидах мембран хлоропластов. Примером могут служить представители рода *Nannochloropsis*, накапливающие эйкозапентаеновую кислоту [65, 66]. Отсутствие лимитирования по N будет способствовать повышению продуктивности культур по липидам, обогащенным ценными жирными кислотами. Кроме того, биомасса МВ, выращенных в таких условиях, характеризуется повышенным содержанием белка и каротиноидов [65], что делает ее оптимальным сырьем для производства кормовых добавок [7].

Производство удобрений

Один из наиболее перспективных способов утилизации биомассы МВ, полученной при очистке животноводческих стоков, — производство удобрений. Установлено, что сразу после внесения сухой биомассы МВ примерно 3% общего N из ее состава доступно для растений, спустя 3 недели этот показатель увеличивается до 33%; аналогичная динамика характерна и для Р. В итоге рост растений огурца и кукурузы на почвах, удобренных выращенной на стоках молочных ферм биомассой МВ, был не хуже, чем при использовании равного количества (в пересчете на N и Р) химических удобрений [2]. Несмотря на потенциально высокую концентрирующую активность МВ в отношении тяжелых металлов, внесения этих загрязнителей с биомассой МВ, полученной на животноводческих стоках, не выявлено [67].

Рентабельность очистки с помощью микроводорослей и способы ее повышения

Затраты на очистку и переработку отходов животноводческих ферм составляют существенную статью расхода в бюджете агропромышленных предприятий. При использовании традиционных технологий с компостированием эти расходы частично компенсировались производством органических удобрений, однако в настоящее время меньше трети навоза в итоге используется в качестве удобрений [18]. В последнее время начинают распространяться технологии, позволяющие извлекать дополнительную выгоду из биогаза (CH_4), получаемого из навоза, помета и животноводческих стоков в метантенках [18]. Использование технологий очистки (доочистки) с помощью МВ позволит дополнительно увеличить отдачу от биопереработки животноводческих стоков прежде всего за счет получения биомассы МВ, которая может

быть переработана с получением ценных продуктов (кормовые добавки, удобрения и т.п., см. выше). Однако при оценке рентабельности технологий очистки, основанных на культивировании МВ, следует учитывать, что рынок биомассы МВ, полученной с использованием животноводческих стоков, к настоящему времени не сложился, и биомасса преимущественно будет перерабатываться “на месте”.

Основные затраты при внедрении технологий очистки стоков с помощью МВ включают капитальные затраты (отчуждение земли под очистные сооружения, строительство, прокладка коммуникаций) и затраты на эксплуатацию (в основном это электроэнергия для перекачки суспензии, освещения ФБР, сушки биомассы и пр.). При использовании интегрированных технологий, включающих предварительную анаэробную переработку животноводческих стоков, потребности в тепловой энергии могут частично либо полностью покрываться биогазом, образующимся на данном этапе. В свою очередь дымовые газы котельной, работающей на биогазе, могут быть использованы как источник CO_2 для культивирования МВ. По оценкам Pizarro и соавт. [68], при использовании интегрированной технологии стоимость очистки составляет (в долл. США): 454 долл./г на одну голову крупного рогатого скота (КРС); 6,2 долл./кг N и 31,1 долл./кг P; стоимость сухой биомассы МВ при этом составит 0,7 долл./кг (в данной оценке последняя не учитывалась). В отсутствие этапа анаэробной переработки с генерацией биогаза затраты будут на 36% выше. Рассчитанная по этим оценкам долгосрочная прибыль должна составить 500 долл./г на одну голову КРС [29, 69].

По-видимому, важным компонентом оценки рентабельности технологий очистки станет экономия на штрафах за загрязнение окружающей среды. В настоящее время предприятиям АПК в России зачастую выгоднее оплачивать штрафы, чем внедрять более совершенные технологии переработки отходов. Однако намечается тенденция к ужесточению природоохранных законов. В итоге она должна привести к тому, что предприятия больше не смогут позволить себе регулярное нарушение нормативов по защите окружающей среды и будут вынуждены внедрять современные технологии очистки, останавливая свой выбор на наиболее практичных и рентабельных.

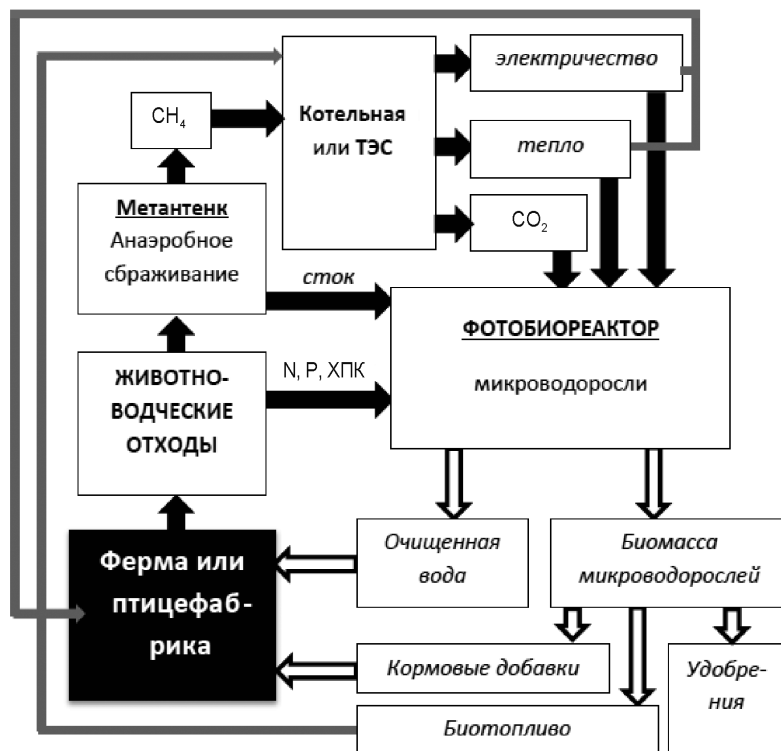
Кроме того, грамотная PR-политика, направленная на формирование у агропромышленного предприятия имиджа “зеленой” компании, будет способствовать продвижению ее продукции на рынке. В основу PR-компании такого предприятия могут лечь такие факторы, как использование “органических” кормов (с добавками из МВ), ответственное отношение к окружающей среде (производство

сельскохозяйственной продукции без сброса сточных вод, отходов и эмиссии парниковых газов).

Выводы и перспективы

Микроводоросли обладают уникальными природными механизмами для эффективного биоизъятия связанного N и P из среды, в том числе и из животноводческих стоков. Будучи фотоавтотрофами, МВ выделяют растворенный O_2 , способствующий быстрому окислению органических компонентов сточных вод. Благодаря этим свойствам, МВ могут быть с успехом использованы для очистки сточных вод животноводческих предприятий и переработки их отходов. Резюмируя результаты многочисленных модельных экспериментов, можно заключить, что инкубация взвешенных или иммобилизованных клеток МВ в сточных водах является весьма перспективным подходом для третичной (заключительной) стадии их очистки. Впрочем, успешное культивирование МВ на животноводческих стоках, прошедших минимальную подготовку (сепарирование), свидетельствует о возможности осуществления полного цикла очистки животноводческих стоков с применением культур МВ.

Оптимальный для умеренных и более холодных широт метод культивирования МВ — интенсивное культивирование в ФБР. Решающее значение для успешной реализации технологии биологической очистки животноводческих стоков с использованием МВ имеют: 1) выбор быстрорастущего штамма МВ, толе-



Возможная схема интегрированной технологии с замкнутым циклом для глубокой переработки отходов животноводства с попутным производством биомассы микроводорослей

рантного к росту в эвтрофных условиях и адаптированного к специфическим особенностям состава стоков конкретного хозяйства; 2) энергоэффективный ФБР для выращивания МВ на стоках, спроектированный и построенный с учетом специфических требований интенсивного культивирования МВ и 3) глубокое понимание физиологии МВ, позволяющее найти режим культивирования, сочетающий сбалансированную нагрузку на биомассу с оптимальной освещенностью, скоростью перемешивания и температурой.

Исследования, результаты которых рассматриваются в настоящем обзоре, свидетельствуют, что наиболее перспективными являются интегрированные технологии, включающие этапы анаэробной обработки животноводческих стоков с целью генерации биогаза и снижения нагрузки эффективной конверсией содержащихся в них органических и неорганических загрязнителей в биомассу МВ с ценными свойствами. Переработка биомассы в кормовые добавки и органические удобрения должна повысить рентабельность традиционных технологий переработки животноводческих отходов. Однако рентабельность систем глубокой переработки и конверсии отходов животноводства с использованием МВ еще нуждается в тщательном анализе, который невозможен без ре-

зультатов пробного внедрения полупромышленных опытных установок.

В заключение следует отметить, что предпочитаемыми являются системы переработки животноводческих стоков и отходов по замкнутой схеме, подобной представленной на рисунке. Отдельные решения в рамках этой схемы, такие как инфраструктура для первичной переработки и метантенки, являются вполне устоявшимися, тогда как разработка других компонентов (например, ФБР и инфраструктура для переработки биомассы МВ) только начинается. Одна из проблем — получение штаммов МВ, толерантных к высоким концентрациям CO_2 и эвтрофным условиям культивирования на животноводческих стоках. Значительную сложность представляет интеграция биотехнологий на основе МВ в цикл очистки и переработки отходов животноводства. Однако последние успехи в биотехнологии микроводорослей дают надежду на скорое решение этих проблем.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (контракт № 14.515.11.0026).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mulbry W., Kondrad S., Pizarro C., Kebede-Westhead E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers // *Bioresour. Technol.* 2008. Vol. 99. P. 8137—8142.
2. Kim M.K., Park J.W., Park C.S., Kim S.J., Jeune K.H., Chang M.U., Acreman J. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater // *Bioresour. Technol.* 2007. Vol. 98. P. 2220—2228.
3. Нтп 17—99. Нормы технологического проектирования систем удаления и подготовки к использованию навоза и помета. М.: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2001. 84 с.
4. Афанасьев А. Анализ технологий переработки навоза и помета // *Вестн. ВНИИМЖ*. 2012. Т. 4. P. 28—35.
5. Oswald W.J., Gotaas H.B. Photosynthesis in sewage treatment // *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* 1957. Vol. 122. P. 73—105.
6. Sivakumar G., Xu J., Thompson R.W., Yang Y., Randol-Smith P., Weathers P.J. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel // *Bioresour. Technol.* 2011.
7. Muñoz R., Guieysse B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review // *Water Res.* 2006. Vol. 40. P. 2799—2815.
8. Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review // *biometals*. 2002. Vol. 15. P. 377—390.
9. Crawford M., Golfetto I., Ghebremeskel K., Min Y., Moodley T., Poston L., Phylactos A., Cunnane S., Schmidt W. The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants // *Lipids*. 2003. Vol. 38. P. 303—315.
10. Wang X., Lin H., Gu Y. Multiple roles of dihomogamma-linolenic acid against proliferation diseases // *Lipids in Health and Disease*. 2012. Vol. 11. P. 25.
11. Cohen Z., Khozin-Goldberg I. Searching for pufa-rich microalgae // *Single Cell Oils* / Eds. Z. Cohen, C. Ratledge. 2010, American Oil Chemists' Society: Champaign IL. P. 201—224.
12. Guschina I.A., Harwood J.L. Algal lipids and their metabolism // *Algae for biofuels and energy* / Eds. M.A. Borowitzka, N.R. Moheimani. Dordrecht; Heidelberg; New York; London: Springer, 2013 P. 17—36.
13. Dhankhar J., Kadian S.S., Sharma A. Astaxanthin: a potential carotenoid // *Intern. J. Pharmaceut. Scien. Res.* 2012. Vol. 3. P. 1246—1259.
14. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions // *Mar. Drugs*. 2011. Vol. 9. P. 1101—1118.
15. Park J.B.K., Craggs R.J., Shilton A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production // *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102. P. 35—42.
16. Georgianna D.R., Mayfield S.P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels // *Nature*. 2012. Vol. 488. P. 329—335.
17. Pittman J.K., Dean A.P., Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources // *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102. P. 17—25.
18. Fu W., Guðmundsson Ó., Paglia G., Herjólfsson G., Andrésson Ó., Pálsson B., Brynjólfsson S. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina*

na with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97. P. 2395—2403.

19. Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource // *New Phytol.* 2003. Vol. 157. P. 423—447.

20. Лебедев Е. Возможные экологические последствия избыточного применения азотных удобрений // *Минеральный и биологический азот в СССР*. М.: Наука, 1985. С. 41—60.

21. Carpenter S.R., Caraco N.F., Correll D.L., Howarth R.W., Sharpley A.N., Smith V.H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen // *Ecol. Appl.* 1998. Vol. 8. P. 559—568.

22. Mulbry W., Kondrad S., Buyer J. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates // *J. Appl. Phycol.* 2008. Vol. 20. P. 1079—1085.

23. Mulbry W., Westhead E.K., Pizarro C., Sikora L. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer // *Bioresour. Technol.* 2005. Vol. 96. P. 451—458.

24. Olguín E.J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes // *Biotechnol. Adv.* 2003. Vol. 22. P. 81—91.

25. Aslan S., Kapdan I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae // *Ecol. Eng.* 2006. Vol. 28. P. 64—70.

26. Ruiz-Marin A., Mendoza-Espinosa L.G., Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater // *Bioresour. Technol.* 2010. Vol. 101. P. 58—64.

27. Kebede-Westhead E., Pizarro C., Mulbry W.W. Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates // *J. Appl. Phycol.* 2006. Vol. 18. P. 41—46.

28. Lincoln E., Wilkie A., French B. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater // *Biomass Bioenergy.* 1996. Vol. 10. P. 63—68.

29. Pizarro C., Mulbry W., Bliersch D., Kangas P. An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent // *Ecol. Eng.* 2006. Vol. 26. P. 321—327.

30. Travieso L., Benitez F., Dupeiron R. Sewage treatment using immobilized microalgae // *Bioresour. Technol.* 1992. Vol. 40. P. 183—187.

31. Hoffmann J.P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae // *J. Phycol.* 2002. Vol. 34. P. 757—763.

32. Jimenez-Perez M., Sanchez-Castillo P., Romera O., Fernandez-Moreno D., Pérez-Martinez C. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure // *Enzyme Microb. Technol.* 2004. Vol. 34. P. 392—398.

33. Richmond A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview // *Hydrobiologia.* 2004. Vol. 512. P. 33—37.

34. Zarmi Y., Bel G., Aflalo C. Theoretical analysis of culture growth in flat-plate bioreactors: the essential role of timescales // *Handbook of Microalgal Culture* / Eds. A. Richmond, Q. Hu. Wiley-Blackwell, 2013. P. 205—224.

35. Lee C.G., Palsson B.O. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes // *Biotechnol. Bioeng.* 1994. Vol. 44. P. 1161—1167.

36. Richmond A., Cheng-Wu Z., Zarmi Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition // *Biomol. Eng.* 2003. Vol. 20. P. 229—236.

37. Vejrazka C., Janssen M., Streefland M., Wijffels R.H. Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in attenuated, flashing light // *Biotechnol. Bioeng.* 2012.

38. König A., Pearson H., Silva S.A. Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds // *Water Sci. Technol.* 1987. Vol. 19. P. 115—122.

39. Masseret E., Amblard C., Bourdier G., Sargos D. Effects of a waste stabilization lagoon discharge on bacterial and phytoplanktonic communities of a stream // *Water Environ. Res.* 2000. Vol. 72. P. 285—294.

40. Javanmardian M., Palsson B.O. High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. Vol. 38. P. 1182—1189.

41. Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J., Chang J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review // *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102. P. 71—81.

42. Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae // *Bioresour. Technol.* 2008. Vol. 99. P. 4021—4028.

43. Camacho Rubio F., Sánchez Mirón A., Cerón García M., García Camacho F., Molina Grima E., Chisti Y. Mixing in bubble columns: a new approach for characterizing dispersion coefficients // *Chem. Eng. Sci.* 2004. Vol. 59. P. 4369—4376.

44. Holland A.D., Wheeler D.R. Intrinsic autotrophic biomass yield and productivity in algae: modeling spectral and mixing-rate dependence // *Biotechnol. J.* 2011. Vol. 6. P. 584—599.

45. Guschina I.A., Harwood J.L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry // *Lipids in Aquatic Ecosystems* / Eds. M. Kainz, M. Brett, M. Arts. Dordrecht, Heidelberg; L.; N.Y.: Springer, 2009. P. 1—24.

46. Lau P., Tam N., Wong Y. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater // *Environ. Pollut.* 1995. Vol. 89. P. 59—66.

47. Lavoie A., de la Noüe J. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment? // *Water Res.* 1985. Vol. 19. P. 1437—1442.

48. Johnson M.B., Wen Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 85. P. 525—534.

49. Abeliovich A., Azov Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds // *Appl. Environ. Microbiol.* 1976. Vol. 31. P. 801.

50. Azov Y., Goldman J.C. Free Ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures // *Appl. Environ. Microbiol.* 1982. Vol. 43. P. 735.

51. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // *Renewable and Sustainable Energy Rev.* 2010. Vol. 14. P. 557—577.

52. Соловченко А., Лобакова Е., Барский Е., Саванина Я., Дольникова Г., Лукьянов А., Кирпичников М. Эколо-

гические фотобиотехнологии для очистки сточных вод // Биотехнология. 2011. № 6.

53. *Abeliovich A.* Water purification: algae in wastewater oxidation ponds // *Handbok of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* / Ed. A. Richmond. Blackwell, 2004. P. 430–438.

54. *Grobbelaar J.* Microalgal biomass production: challenges and realities // *Photosynthesis Res.* 2010. Vol. 106. P. 135–144.

55. *Morweiser M., Kruse O., Hankamer B., Posten C.* Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 87. P. 1–11.

56. *Molina Grima E., Fernandez F., García Camacho F., Chisti Y.* Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup // *J. Biotechnol.* 1999. Vol. 70. P. 231–247.

57. *Pulz O., Scheibbogen K.* Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input // *Bioprocess and algae reactor technology* / Ed. T. Scheper. Berlin; Heidelberg: Springer, 1998. P. 123–152.

58. *de-Bashan L.E., Bashan Y.* Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects // *Biore-sour. Technol.* 2010. Vol. 101. P. 1611–1627.

59. *Abe K., Takahashi E., Hirano M.* Development of laboratory-scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* (Chlorophyta) // *J. Appl. Phycol.* 2008. Vol. 20. P. 283–288.

60. *Zhang E., Wang B., Wang Q., Zhang S., Zhao B.* Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment // *Biore-sour. Technol.* 2008. Vol. 99. P. 3787–3793.

61. *Molina Grima E., Belarbi E.H., Acien Fernandez F., Robles Medina A., Chisti Y.* Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics // *Biotechnol. Adv.* 2003. Vol. 20. P. 491–515.

62. *Divakaran R., Sivasankara Pillai V.* Flocculation of algae using chitosan // *J. Appl. Phycol.* 2002. Vol. 14. P. 419–422.

63. *Olaiyola M.* Microalgal removal of CO₂ from flue gases: changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultu-

res // *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2003. Vol. 8. P. 360–367.

64. *Соловченко А.* Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // *Физиол. раст.* 2012. Т. 59. С. 192–202.

65. *Vooren G.V., Le Grand F., Legrand J., Cuiné S., Pel-tier G., Pruvost J.* Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application // *Biore-sour. Technol.* 2012.

66. *Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Recht L., Boussi-ba S.* Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids // *Mar. Biotechnol.* 2011. Vol. 13. P. 527–535.

67. *Wilkie A.C., Mulbry W.W.* Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae // *Biore-sour. Technol.* 2002. Vol. 84. P. 81–91.

68. *Woertz I., Feffer A., Lundquist T., Nelson Y.* Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock // *J. Environ. Eng.* 2009. Vol. 135. P. 1115–1122.

69. *An J.-Y., Sim S.-J., Lee J., Kim B.* Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus Braunii* // *J. Appl. Phycol.* 2003. Vol. 15. P. 185–191.

70. *Korzhenevskaya T., Baulina O., Gorelova O., Lobacova E., Butenko R., Gusev M.* Artificial syncyanoses: the potential for modeling and analysis of natural symbioses // *Symbiosis.* 1993. Vol. 15. P. 77–103.

71. *Antal T.K., Kolacheva A., Maslakov A., Riznichenko G.Y., Krendeleva T.E., Rubin A.B.* Study of the effect of reducing conditions on the initial chlorophyll fluorescence rise in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* // *Photo-synthesis Res.* 2013. Vol. 114. P. 143–154.

72. *Holland A.D., Wheeler D.R.* Intrinsic autotrophic biomass yield and productivity in algae: modeling spectral and mixing-rate dependence // *Biotechnol. J.* 2011. Vol. 6. P. 584–599.

73. *Holzwarth A.R., Lenk D., Jahns P.* On the analysis of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching curves I) Theoretical considerations // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics.* V.

Поступила в редакцию
16.05.13

POSSIBILITIES OF MICROALGAL BIOCONVERSION OF AGRICULTURAL WASTE

*A.E. Solovchenko, A.A. Lukyanov, S.G. Vasilieva, Ya.V. Savanina,
O.V. Solovchenko, E.S. Lobakova*

The present review considers a new methodology of biological treatment and conversion of farm waste (manure and wash water) with the use of intensively cultivated phototrophic microorganisms (microalgae). Criteria for selection of microalgae and peculiarities of their intensive cultivation for efficient removal of biogenic elements and destruction of organic components of the wastes as well as the possibilities of cost-effective utilization of the resulting microalgal biomass are reviewed. Advantages and drawbacks of the new methodology are compared with those of conventional anaerobic techniques. Special attention is paid to the integrated technologies combining the aerobic conversion methods with microalgal post-treatment.

Key words: anaerobic conversion, bioremoval, microalgae, photobioreactor, photosynthetic aeration.

Сведения об авторах

Соловченко Алексей Евгеньевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Лукьянов Александр Андреевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-25-87; e-mail: loockart@mail.ru

Васильева Светлана Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-25-87; e-mail: vankat2009@mail.ru

Саванина Янина Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-41-69; e-mail: gene_b@mail.ru

Соловченко Ольга Владимировна — канд. биол. наук, лаборант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-25-87; e-mail: olyasov@mail.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-41-69; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

**Указатель статей, опубликованных
в журнале “Вестник Московского университета.
Серия 16. Биология” в 2013 году**

	№	Стр.
Биохимия		
Путляев Е.В., Смирнов А.А., Лазарева Е.А., Клинк Г.В., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Новый фитовирусный вектор для суперэкспрессии целевых белков в растениях	3	17
Сереженикова Н.Б., Зак П.П., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Липина Т.В., Островский М.А. Субклеточные маркеры старения ретикулярного пигментного эпителия японского перепела <i>Coturnix japonica</i>	3	9
Хапчаев Ш.Ю., Готор С.С., Каминский И.П., Кремер Е.Э., Кривошёрков С.В., Мильто И.В., Першина А.Г., Петрова И.В., Салтыкова И.В., Субботина Н.С., Хворилова К.В. Концентрация токсинов в эндосомальном компартменте клеток, преобразованных ризинном и вискумином	4	14
Генетика		
Зверков О.А., Русин Л.Ю., Селиверстов А.В., Любецкий В.А. Изучение вставок прямых повторов в микроэволюции митохондрий и пластид растений на основе кластеризации белков.	1	8
Рожнов В.В., Пищулина С.Л., Мещерский И.Г., Симакин Л.В. О соотношении фенотипа и генотипа соболя и лесной куницы в зоне симпатрии на Северном Урале	3	23
Геронтология		
Хохлов А.Н. Эволюция термина “cellular senescence” и ее влияние на состояние современных цитогеронтологических исследований	4	18
Яблонская О.И., Рындина Т.С., Воейков В.Л., Хохлов А.Н. Парадоксальное влияние гидратированного C ₆₀ -фуллереина в сверхнизкой концентрации на жизнеспособность и старение культивируемых клеток китайского хомячка	1	14
Микология и альгология		
Анисимова О.В., Кезля Е.М. Сезонная динамика доминантных комплексов водорослей в малых водоемах Центрально-Черноземного заповедника (лесостепная зона)	2	16
Житина Л.С., Ильаш Л.В. Состав и обилие фитопланктона Байдарцкой губы Карского моря в летний и осенний периоды	2	22
Куликовский М.С., Шкурина Н.А., Белякова Г.А. Морфология и систематика <i>Stephanodiscus minutulus</i> (Kützinger) Cleve et Möller (Bacillariophyta) из озера Дальнее (Камчатка)	1	39
Толпышева Т.Ю. Новые местонахождения видов грибов, занесенных в Красную книгу Тверской области	2	20
Фауна, флора		
Артемяева Е.А., Муравьев И.В., Бёме И.Р. Желтая трясогузка <i>Motacilla flava</i> Linnaeus, 1758 (Passeriformes, Motacillidae, Motacillinae) в Среднем Поволжье: географическое распространение, биотопы гнездования и численность	2	43
Борисанова А.О., Малахов В.В. Строение покровов тела Kamptozoa на примере вида <i>Barentsia discreta</i> Busk, 1886.	3	44
Всеволодов Э.Б., Сарсеева Г.Ж., Латыпов И.Ф., Алиев Л., Голиченков В.А., Мусаева А.С., Жапбаров Р. Распределение волос по диаметру при межвидовой гибридизации овец.	1	45
Полева С.В., Авраменко А.С. Морфология и ультраструктура современных и ископаемых спор папоротников порядка Shizaeales Schimp	3	48
Тиханков И.А. Анатомические особенности проводящей системы листьев <i>Lolium perenne</i> L., сформировавшиеся под влиянием гидразида малеиновой кислоты.	3	39
Физиология		
Иноземцев А.Н. Анализ природы следа памяти в условной реакции пассивного избегания	1	3
Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Майстренко Е.С. Противосвертывающие эффекты комплексного соединения пролина с гепарином	2	3

<i>Мальшев А.В., Захаров А.М., Саркисова К.Ю., Дубынин В.А.</i> Влияние хронического введения малых доз клебоприда на поведенческие реакции белых крыс.	4	3
<i>Маркина А.А., Кондратьева И.А.</i> Исследование защитных свойств биополимеров углеводной природы <i>Shigella sonnei</i> на моделях эндотоксического шока	2	12
<i>Молчанов А.Ю., Ивановская М.Г.</i> Мелатонин и деторождение. Часть 1. Доимплантационный период и имплантация	3	3
<i>Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Никольская К.А.</i> Противосвертывающая система у животных, обучающихся на фоне совместного действия слабого постоянного магнитного поля и опиоидного пептида опилонга	4	9
<i>Сангаджиева А.Д., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Гусева А.А., Шаповал И.М., Осипова В.А., Мезенцева М.В., Андреева Л.А.</i> Изменение цитокинового профиля крыс при протекторных противоязвенных эффектах глипролинов. Влияние глипролинов (PGP и N-acetyl-PGP) на экспрессию генов цитокинов при этаноловом повреждении желудка	2	7

Экология

<i>Барский Е.Л., Дольникова Г.А., Саванина Я.В., Белоусова Е.Е., Карпова Е.Ю., Дедов А.Г., Лобакова Е.С.</i> Преобразование углеводов спиртовой барды ассоциациями микроорганизмов, иммобилизованных на полимерных матрицах	2	36
<i>Гершкович Д.М., Исакова Е.Ф., Филенко О.Ф., Самойлова Т.А.</i> Повышение жизнестойкости рачков <i>Ceriodaphnia affinis</i> Lilljeborg с применением 10-(2',3'-диметилхинонил-6')-децилтрифенилфосфоний бромида	2	27
<i>Кондакова Г.В., Верховцева Н.В., Остроумов С.А.</i> Изучение углеводородокисляющих микроорганизмов глубоких подземных вод Пучеж-Катунской импактной структуры	2	31
<i>Мошарова И.В., Ильинский В.В., Мошаров С.А., Азовский А.И.</i> Распространение полихлорбифенил-трансформирующих и полихлорбифенил-толерантных бактерий в морях умеренных и полярных широт с различными уровнями загрязнения полихлорированными бифенилами	1	28
<i>Недосекин А.Г., Далакян Г.А.</i> Вариабельность продукционных характеристик и содержания макромолекул в клетках микроводорослей в период роста.	1	36
<i>Недосекин А.Г., Хазанова К.П., Братковская Л.Б., Плеханов С.Е.</i> Влияние пирокатехина на фотосинтетические характеристики культуры водорослей	4	23
<i>Рязанова Г.И., Полыгалов А.С.</i> Флуктуирующая асимметрия жилкования крыла у стрекоз <i>Ishnura elegans</i> (V.d. Lind.) (Odonata, Coenagrionidae) и перспективы использования ее в качестве биологического индикатора экологического состояния водоемов	3	27
<i>Саванина Я.В., Фомина И.А., Барский Е.Л., Королева С.Ю., Королев Ю.Н., Лобакова Е.С.</i> Диализная культура как индикатор изменений показателей водных ресурсов	1	21
<i>Северцова Е.А., Никифорова А.И., Агильон Гутиеррес Д.Р.</i> Спектрохимический и гистохимический анализ тканей головастика травяной лягушки и серой жабы, развивавшихся в условиях имитации загрязнения свинцом и железом	4	27
<i>Соловченко А.Е., Лукьянов А.А., Васильева С.Г., Саванина Я.В., Соловченко О.В., Лобакова Е.С.</i> Возможности биотехнологической переработки сельскохозяйственных отходов с использованием микроводорослей	4	38
<i>Холоимова А.С.</i> Биологические методы экологической диагностики как эффективный способ оценки качества природной среды	4	33
<i>Чертопруд М.В., Палатов Д.М.</i> Фауна и сообщества реофильного макробентоса восточной части Новосибирской области: эффекты крупномасштабного экотона	3	33

Даты

<i>Колотилова Н.Н.</i> К 80-летию со дня рождения академика РАН Георгия Александровича Заварзина	1	51
<i>Белякова Г.А., Саванина Я.В.</i> Международная биологическая универсиада в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова	1	52

ТРЕБОВАНИЯ ДЛЯ ПРЕДСТАВЛЯЕМЫХ СТАТЕЙ

Статьи, направляемые в журнал “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология”, должны удовлетворять следующим требованиям.

1. Структура статьи должна включать краткое введение с ясным изложением состояния проблемы, описание объектов и методов, изложение и обсуждение результатов, выводы. Главное требование к описанию основной части публикуемого исследования — возможность воспроизведения полученных результатов другими специалистами. Следует избегать повторений. В частности, не допускается включение между введением и основным текстом перечисления полученных результатов, которые будут приведены ниже. Выводы должны быть действительно выводами, а не текстуальным перечислением по пунктам уже описанных результатов.

2. Статьи представляются в электронной форме в формате MS WORD, а также распечатанные через **два интервала** на листах формата А4 (верхнее и левое поля не менее 3 см). Объем статьи не должен превышать 10 страниц текста с размером шрифта Times New Roman 12 кегль. В левом верхнем углу первой страницы рукописи следует указать **рубрику**, ниже — индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы, авторы с инициалами перед фамилиями, наименование подразделения биологического факультета (кафедра, лаборатория), e-mail первого автора, русское резюме с ключевыми словами (3—5). Все страницы рукописи с вложенными таблицами должны быть пронумерованы. После списка литературы прилагается резюме статьи на английском языке (не более 8 строк каждое) с указанием названия статьи и фамилий авторов (инициалы перед фамилией), а также ключевых слов (3—5). Текст резюме должен содержать основные результаты без декларативных утверждений и упоминания значимости проблемы.

3. После текста английского резюме обязательно указываются сведения об авторах: фамилия, имя и отчество (полностью), научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

4. Число таблиц не должно превышать 3—4, рисунков 3—4. Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах.

5. Графические иллюстрации и фотографии предоставляются в электронном виде на **отдельном диске в формате tiff** соответственно на электронном носителе формата CD (пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей). Рисунки (каждый) и подписи к рисункам и фотографиям предоставляются на отдельных листах **в 2 экз.**

6. В тексте ссылка на список литературы оформляется в **квадратных скобках (в порядке перечисления в тексте)** с указанием номера источника. Если осуществляется ссылка на несколько источников, то они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, *например*: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [1—5].

7. Цитируемая литература приводится в пронумерованном (не по алфавиту, а в порядке перечисления в тексте) списке в конце статьи.

Источники в списке литературы оформляются следующим образом:

Книга: Автор (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство, год. Общее количество страниц (например: 336 с.).

Статья в сборнике: Автор. Название статьи // Название сборника / Под ред. А.Б. Иванова. Город: Издательство (без кавычек), год. С. 5—7.

Статья в журнале: Автор. Название статьи // Журнал (возможно принятое сокращенное название). Год. Том (Т. (рус.) или Vol. (англ.)). Номер (выпуск). С. 15—20.

Автореферат (канд., докт): Автор. Название: (двосточие) Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. М. (город), год. 54 с.

Электронный ресурс: *например:* Официальный сайт ЮНЕСКО (URL: <http://www.unesco.org> 27.10.2009) (дата последнего посещения).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

8. После списка литературы авторы делают подпись “Поступила в редакцию...” с указанием даты сдачи рукописи в редколлегию. Все страницы соединять только скрепками.

9. Все размерности физических величин должны даваться в соответствии с Международной системой единиц (СИ).

10. При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов в скобках обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид).

11. Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.

12. Подробнее с оформлением текста статей и списка литературы можно ознакомиться на веб-сайте: <http://git.bio.msu.ru/vestnik.html>