

## Литература

1. Yaskowiak ES, Shears MA, Agarwal-Mawal A, Fletcher GL. Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1alpha) responsible for enhanced growth rates in Atlantic Salmon. *Transgenic Res.* 2006;15:465-80.
  2. Zeng Z, Liu X, Seebah S, Gong Z. Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters. *Dev Dyn* 2005; 234:387-92.
  3. Андреева Л.Е., Дворянчиков Г.А. Анализ экспрессии RSV-lacZ-гена в трансгенных эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis L.* при различных вариантах инъекций. *Генетика* 1995; 31:759-66.4.
  4. Дворянчиков Г.А., Серова И.А., Андреева Л.Е., и др. Секреция биологически активного гранулоцит колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в молоке трансгенных мышей. *Генетика* 2005; 41:1330-7.
  5. Amin J, Mestrlil R. Schiller P. et al. Organization of the *Drosophila melanogaster* hsp70 heat shock regulation unit. *Mol Cell Biol* 1987; 7:1055.
  6. Андреева Л.Е., Слепцова Л.А., Григоренко А.П. и др. Сперматозоиды вьюна переносят чужеродную ДНК, экспрессия которой обнаруживается на стадиях раннего развития. *Генетика*, 2003; 39: 758-761.
  7. Krone PH, Evans TG, Blechinger SR. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin. Cell Dev Biol* 2003; 14:267-74.
- Работа поддержана подпрограммой "Динамика генофондов" Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛКОКСИСИЛИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ГРУНТОВЫХ ВОД ОТ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Цветкова Е.А.<sup>1</sup>, Куликова Н.А.<sup>2</sup>, Карпюк Л.А.<sup>2</sup>, Перминова И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Одной из основных проблем микробиологической чистоты окружающей среды является ее загрязнение грам-отрицательными бактериями, характеризующимися быстрым ростом практически во всех природных средах, содержащих в достаточном количестве воду. Внешняя мембрана грам-отрицательных бактерий содержит липополисахарид (ЛПС), являющийся эндотоксином. ЛПС представляет

собой высокотоксичное вещество, подавляющее иммунную систему человека и обуславливающее ряд патологических состояний: от желудочно-кишечных расстройств до респираторных заболеваний и лихорадок. Часто при изменении внешних условий бактерии погибают, а ЛПС из их клеточных стенок высвобождается и поступает в окружающую среду и, в частности, в природные воды [1, 15]. Указанная проблема вызывает необходимость создания технологий очистки грунтовых вод от ЛПС с использованием сорбентов, обладающих высоким сродством к эндотоксинам. Принимая во внимание, что в настоящее время микробиологическое загрязнение сопровождается, как правило, наличием в среде таких загрязняющих веществ как ксенобиотики и тяжелые металлы, особый интерес вызывают сорбенты, характеризующиеся способностью одновременно связывать экотоксиканты различных классов. Наиболее перспективными с этой точки зрения являются сорбенты, полученные на основе гуминовых веществ.

Гуминовые вещества (ГВ) – это сложные смеси устойчивых к биодеструкции высокомолекулярных темноокрашенных органических соединений природного происхождения, образующихся при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды [18]. ГВ представляют собой макрокомпоненту органического вещества почвенных и водных экосистем, а также твердых горючих ископаемых.

Несмотря на такие фундаментальные свойства ГВ как нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность, для ГВ характерен единый принцип строения: наличие каркасной части, т.е. ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, среди которых преобладают карбоксильные, гидроксильные и метоксильные, и периферической части, обогащенной полисахаридными и полипептидными фрагментами. В силу сложности строения, уникально широк спектр взаимодействий, в которые могут вступать ГВ и, в особенности, их наиболее реакционноспособная часть – гуминовые кислоты (ГК).

Одной из важнейших функций ГК в биосфере является протекторная, под которой в настоящее время подразумевают их способность связывать в прочные комплексы как ионы металлов, так и органические экотоксиканты в загрязненных водных и почвенных средах [18]. Экологические последствия такого связывания – изменение форм существования экотоксикантов и их миграционной способности [17], уменьшение биодоступности [2,6] и токсичности [3]. Последнее обстоятельство весьма важно, т.к. максимальной активностью обладает

свободная форма токсиканта, а связанное вещество свою токсичность теряет. На этом основании ГК рассматривают как природные детоксиканты, что делает их перспективными препаратами для рекультивации территорий, загрязненных органическими веществами [4], в том числе ПАУ [7] и нефтепродуктами [8, 19], а также тяжелыми металлами [11-14, 16]. За рубежом разработаны и используются твердые сорбенты на основе ГК, предназначенные для очистки грунтовых вод путем создания на их основе проникающих реакционных барьеров [11,12]. Основным недостатком этих технологий является дороговизна экскавации грунта с целью замены его на сорбент. Нами был предложен способ модификации ГК с целью получения их алкоксисилилированных производных, обладающих высокой способностью к иммобилизации на силикагеле, представляющем собой аналог основного материала водоносных горизонтов [9]. Это позволяет использовать получаемые производные не в виде твердых сорбентов, а в виде растворов, предназначенных для закачивания в скважины. Было показано, что образующиеся соединения силикагеля с модифицированными ГК характеризуются высокой сорбционной способностью по отношению к радиоактивным металлам, что позволяет сделать вывод о перспективах использования модифицированных ГК в технологиях очистки грунтовых вод от радиоактивных металлов [10].

Целью данной работы была оценка связывающей способности соединений силикагеля с алкоксисилилированными производными ГК по отношению к ЛПС.

**Материалы и методы.** *Получение соединений силикагеля с алкоксисилилированными производными ГК.* Для получения сорбента использовали продажный препарат гумата калия леонардита Powhumus (Humintech, Германия). Навеску препарата растворяли в дистиллированной воде и центрифугировали для отделения нерастворимой минеральной части. Затем раствор подкисляли до pH 2 с помощью концентрированной HCl и вторично центрифугировали, осаждая при этом ГК. Осадок ГК многократно промывали дистиллированной водой, обессоливали с помощью диализа и высушивали на роторном испарителе при 60°C.

Полученный препарат ГК модифицировали согласно разработанной нами методике [9]. Препарат ГК обрабатывали 3-аминопропил-метоксисиланом (АПТС, осч, Acros Ltd.), получая модифицированные гуминовые кислоты ГК-АПТС. Полученный препарат ГК-АПТС иммобилизовали на силикагеле SiO<sub>2</sub> (Merck, Германия) согласно [9] и получали сорбент ГК-АПТС-SiO<sub>2</sub>.

*Липополисахарид.* Для экспериментов использовали ЛПС, выделенный из культуры кишечной палочки *Escherichia coli* и любезно

предоставленный н.с. к.х.н. М.А. Проскурниным (химический факультет МГУ им. Ломоносова).

*Проведение сорбционных экспериментов.* Сорбцию ЛПС на ГК-АПТС-SiO<sub>2</sub> изучали методом изотерм. Растворы ЛПС в диапазоне концентраций 4-20 мкг/мл готовили в 0.15 М NaCl. К 50 мг силикагеля или модифицированного силикагеля ГК-АПТС-SiO<sub>2</sub> добавляли по 1.2 мл раствора ЛПС соответствующей концентрации и инкубировали при комнатной температуре при перемешивании в течение 22 ч, после чего суспензии центрифугировали для отделения сорбированного ЛПС, а в супернатанте определяли концентрацию несорбированного ЛПС. Определение концентрации ЛПС проводили спектрофотометрически при 466 нм по реакции с карбоцианиновым красителем (StainsAll, Aldrich) [5]. На основании полученных данных рассчитывали количество ЛПС, сорбированного на модифицированном и исходном силикагеле, и строили изотермы сорбции.

**Результаты и их обсуждение.** Полученные изотермы сорбции ЛПС на исходном и модифицированном силикагеле представлены на рис. 1.

Как видно, из рисунка, полученные изотермы сорбции ЛПС на исходном силикагеле имели L-тип, описываемый изотермой Лэнгмюра. Изотермы сорбции ЛПС на модифицированном силикагеле принадлежали к S-типу с пологим уклоном в области низких концентраций и с перегибом в диапазоне равновесных концентраций ЛПС 1-3 мкг/мл. Подобный тип изотерм наблюдают в случаях, когда молекулы сорбата не обладают высоким сродством к поверхности сорбента до тех пор, пока не происходит значительного заполнения поверхности последнего. При достижении необходимого уровня заполнения поверхности характер изотермы меняется и начинается резкое увеличение сорбции. Указанное явление связано с изменением свойства поверхности сорбента под действием сорбата или с взаимодействием сорбата с ранее сорбированными молекулами. Можно предположить, что в случае сорбции ЛПС на модифицированном силикагеле в диапазоне концентраций 1-3 мкг/мл происходит смена механизма сорбции. По-видимому, сначала происходит сорбция ЛПС на участках силикагеля, не занятых ГК, а затем начинается сорбция ЛПС непосредственно на ГК, пришитых к силикагелю. Следует отметить, что механизм сорбции ЛПС на ЛПС в данном случае, по-видимому, не играет определяющей роли. В противном случае формы изотерм сорбции ЛПС на исходном и модифицированном силикагеле принадлежали к одному типу.

Для описания полученных изотерм использовали модифицированное уравнение Ленгмюра, которое учитывает

зависимость коэффициента распределения от степени заполнения поверхности:

$$q = Q_{max} \left( \frac{(K_d e^{-2bq} C_w)}{1 + (K_d e^{-2bq} C_w)} \right)$$

где  $q$  – количество сорбированного ЛПС,  $C_w$  – равновесная концентрация ЛПС,  $Q_{max}$  – максимальная адсорбция,  $K_d$  – коэффициент распределения,  $b$  – параметр, характеризующий сродство сорбента к сорбату.

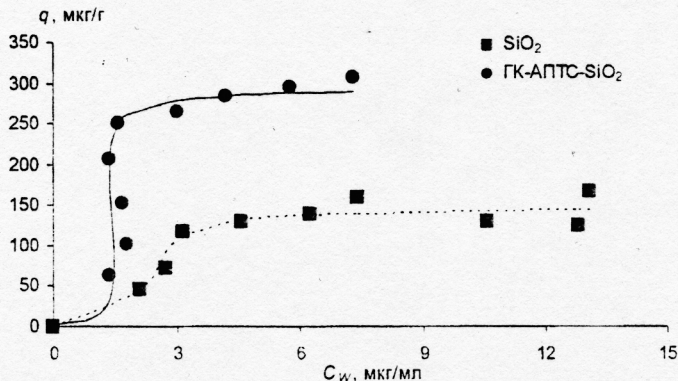


Рис. 1. Изотермы сорбции ЛПС на исходном и модифицированном силикагеле.

Расчитанные значения максимальной сорбции ЛПС составили  $148 \pm 5$  и  $295 \pm 9$  мг/кг для исходного и модифицированного силикагеля, соответственно, что указывает на значимые увеличение сорбционной способности  $\text{ГК-АПТС-SiO}_2$  по сравнению с исходным силикагелем.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования атлоксисилилированных производных ГК для очистки грунтовых вод от ЛПС.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (06-04-49017а) и US DOE (RUC2-20006).

#### Литература

1. Aguirre F., Kapoor A., Sahay R.R., Wozniak A.L. 2003. Microbiological contaminated building materials assessments and resulting biologically active components.

[http://www.imakenews.com/pureaircontrols/e\\_article000145091](http://www.imakenews.com/pureaircontrols/e_article000145091).

2. Black M., Mccarthy J. 1988. Dissolved organic macromolecules reduce the uptake of hydrophobic organic contaminants by the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Environ. Toxicol. Chem. 7, 593-600.
3. Bollag J.M., Myers C. 1992. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances, Sci. Total Environ. 117/118, 357-366.
4. Fukushima M. and Tatsumi K 2001. Degradation characteristics of humic acid during photo-Fenton processes. Analyt. Sci., 17, i821-i823.
5. Janda J. and Work E. 1971. A colorimetric estimation of lipopolysaccharides, FEBS Letters, 16, 343-345.
6. Landrum P.F., Reinhold M.D., Nihart S.R., and B.J. Eadie. 1985. Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia Hoyo* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. Environ. Toxicol. Chem. 4, 459-467.
7. Lesage S., Novakowski K.S., Brown S. and Millar K. J. 2001. Humic acids enhanced removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers: developing a sustainable technology. Environ. Sci. Health A, 36, 8, 1515-1533.
8. Molson J.W., Frind E.O., Van Stempvoort D.R., Lesage S. 2001. Humic acid enhanced remediation of an emplaced diesel source in groundwater. 2. Numerical model development and application. J. Contam. Hydrol., 54(3-4), 277-305.
9. PCT application RU2006/000102. Humic derivatives, methods of preparation and use. Filed on March 7, 2006.
10. Perminova I.V., Karpiuk L.A., Shcherbina N.S., Ponomarenko S.A., Kalmykov S.N., and Hatfield K. 2007. Preparation and Use of Humic Coatings Covalently Bound to Silica Gel for Np(V) and Pu(V) Sequestration, Environ. Sci. Technol. (submitted).
11. Sanjay H.G., Srivastava K.C., Walia D. S. 1997.  
[http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/97/97em/em\\_pdf/EMPI-9.PDF](http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/97/97em/em_pdf/EMPI-9.PDF)
12. Sanjay H.G., Srivastava K.C., Walia D.S. 1997. Mixed Waste Remediation Using HUMASORB-CSTM-an Adsorbent to Remove Organic and Inorganic Contaminants. ARCTECH, Inc., 14100 Park Meadow Drive, Suite 210, Chantilly, Virginia 20151.  
[http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/97/97em/em\\_pdf/EMPI-9.PDF](http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/97/97em/em_pdf/EMPI-9.PDF)
13. Sawada A., Tanaka S., Fukushima M., Tatsumi K. J. 2003. Electrokinetic remediation of clayey soils containing copper(II)-oxinate using humic acid as a surfactant. Hazard. Mater., B96, 145-154.

14. Schwartz D.L. 1999. Coal-derived humic acid for removal of metals and organic contaminants. Solid waste and emergency response (5102G), EPA 542-N-99-002. 31, 1.
15. Stewart I., Schluter Ph.J., Shaw G.R. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. Environmental Health: A Global Access Science Source, 5:7, doi:10.1186/1476-069X-5-7.
16. Ильин В.Б. 1991. Тяжелые металлы в системе «почва-растение». Новосибирск, Наука, 360 с.
17. Варшал Г.М., Бугаевский А.А., Холин Ю.В., Мерный С.А., Велюханова Т.К., Кошечева И., Красовицкий А.В. 1990. Моделирование равновесий в растворах фульвокислот природных вод, Химия и технология воды 12(11), 979-986.
18. Орлов Д.С. 1993. Свойства и функции гуминовых веществ. В сб.: Гуминовые вещества в биосфере. М., Наука, 16-27.
19. Салем К.М., Перминова И.В., Гречищева Н.Ю., Мурыгина В.П., Мещеряков С.В. 2003. Использование гуминовых препаратов при биорекультивации нефтезагрязненных почв. Экология и промышленность России, апрель, 19-21.

## **АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ (ЛИПИДЫ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И РЫБ)**

\*Черткоева З.А., \*Карагодин В.П., Глазер В.М., Костромина Н.В.,  
Полякова О.В., Котелевцев С.В.

\*Российская экономическая академия им. Г.В.Плеханова;  
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,  
E-mail:Kotelevtsev@yandex.ru

Мутагенные и канцерогенные соединения проявляют биологический эффект в очень низких концентрациях, их химико - аналитическое определение в биологических тканях не редко затруднено. С другой стороны, химическими методами невозможно определить, обладает то или иное вещество канцерогенными и мутагенными свойствами. В связи с этим биотехнологические методы анализа присутствия мутагенных соединений в пищевых продуктах приобретают все большее значение.

Действительно, только с помощью биотестирования можно определить как опасные так и положительные, биологически активные свойства различных компонентов, в том числе и используемых в качестве биологически активных добавок – БАД.