

1. Оценка динамики состояния зеленых насаждений в парке выявила ухудшение состояния древостоя на площадке №3 в 2020 г. по отношению к 2017 г.

2. При этом породный состав зеленых насаждений парка не изменился в течение всего периода наблюдения. Был составлен список древесных пород, наиболее часто встречающихся в парке.

3. При определении динамики показателей антропогенной нагрузки было установлено увеличение загрязнения в глубине парка.

В результате было установлено, что парк «Дружбы народов» по своему состоянию относится к паркам со средними рекреационными нагрузками (50 чел/га, показатель озелененности – 75–80%). Основные виды рекреационного использования – прогулки, выгул собак, занятие спортом, проведение ярмарок. Вытоптанность составила 3.2%. Парк слабо оборудован для такого использования: недостаточно мест для отдыха (скамейки, беседки и т.д.), отсутствуют контейнеры для раздельного сбора мусора. Основным видом мусора являются упаковки от фаст-фуда, окурки, пластиковые, жестяные, стеклянные бутылки. Состояние древостоя ухудшается локально на площадке возле разворотного кольца площади Бангалор.

В результате проведенного исследования был сделан вывод о том, что состояние этой рекреационной зоны нельзя считать удовлетворительным и необходимо предпринимать меры по оптимизации экологического состояния этого парка. Требуется улучшить инфраструктуру парка, установить контейнеры для раздельного сбора мусора, что защитит древесные насаждения и снизит уровень антропогенной нагрузки на биотопы. Кроме того, необходимым условием улучшения экологической обстановки на территории парка будет уменьшение транспортного потока и связанных с ним выбросов в окружающую среду, что может быть достигнуто после ввода в эксплуатацию новых станций третьей линии метрополитена. Совершенно очевидно, что нынешнее состояние этой рекреационной зоны нельзя считать удовлетворительным и необходимо предпринимать меры по оптимизации состояния этого парка. Требуется улучшить инфраструктуру парка «Дружбы народов» как рекреационного объекта, что защитит древесные насаждения и снизит уровень антропогенной нагрузки на биотопы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Практикум по индивидуальным работам для студентов 1-го курса факультета экологической медицины МГЭУ им. Сахарова (комплексная экологическая практика) / Е.Ю. Жук, О.В. Колеснева, А.В. Каморникова. Минск: МГЭУ им. Сахарова, 2006. С. 33–40.

2. Мельник, Е. Практическое руководство по методике проведения различных видов экологического мониторинга учреждениями образования, в том числе «зелеными школами» без использования сложного оборудования: практическое руководство / Е. Мельник. Минск, 2019. С. 61–63.

3. Цяпловская, А. В. Лесные ресурсы, оценка, состояние, экологические проблемы лесов и пути их решения : учебно-методическое пособие / А.В. Цяпловская, Л.А.Кривель. Минск, 2005. С. 31–52.

4. Якушев, Б. И. Эколого-географический анализ видов мохообразных в различных типах еловых лесов Беларуси / Б. И. Якушев, Ж. М. Анисова: Минск: Асвета, 2007. С.17–25.

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА КЕРАТИНАЗЫ STUDYING THE POSSIBILITY OF CREATING A BACTERIAL KERATINASE-PRODUCING STRAIN

**Дж. А. Миронова<sup>1</sup>, М. А. Чиндарева<sup>2</sup>, А. И. Зинченко<sup>1,2</sup>**  
**J. Mironova<sup>1</sup>, M. Chindareva<sup>2</sup>, A. Zinchenko<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
dzhesikamironova29@mail.ru

<sup>2</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь  
zinch@mbio.bas-net.by

<sup>1</sup>Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, NAS, Minsk, Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Среди всех существующих методов разложения кератина наиболее перспективным является ферментативный гидролиз с применением рекомбинантных сверхпродукторов, в частности *Bacillus licheniformis*, где преимущество заключается в простоте, низкой стоимости и большом выходе целевого продукта. Кератиназы, специфично гидролизующие кератиноподобные белки, отличаются устойчивостью к деградации обычными протеолитическими ферментами, и гораздо в меньшей степени – в отношении комплекса щелочных

протеаз, необходимых для гидролиза растительных белков. В свою очередь микроорганизмы, обладающие кератинолитической активностью, представляют потенциал для биотехнологий.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось изучение возможности создания рекомбинантного бактериального штамма, продуцирующего высокоактивную кератиназу.

Among all the existing methods of keratin decomposition, the most promising one is enzymatic hydrolysis with the use of recombinant super-producers, in particular *Bacillus licheniformis*, with the advantage is simplicity, low cost and a large yield of the target product. Keratinases, which specifically hydrolyze keratin-like proteins, are resistant to degradation by conventional proteolytic enzymes, and to a much lesser extent-with respect to the complex of alkaline proteases necessary for the hydrolysis of plant proteins. In turn, microorganisms with keratinolytic activity represent a potential for biotechnologies.

In connection with the above, the purpose of this work was to study the possibility of creating a recombinant bacterial strain that produces highly active keratinase.

*Ключевые слова:* кератин, кератиназы, кератинолитические микроорганизмы, кератиновые отходы.

*Keywords:* keratin, keratinase, keratinolytic microorganisms, keratin waste.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-300-304>

Кератины представляют собой нерастворимые в воде фибриллярные белки, которые являются главной компонентой покровной системы человека и животных [1, 2]. Они присутствуют в эпидермисе и составляют основу перьев, волос, шерсти, ногтей, копыт и рогов. Содержащие кератин материалы образуются в изобилии как побочные продукты в ходе различных агропромышленных процессов. Из всех ороговевших отходов самое большое количество кератина содержат перья. Они в большом количестве образуются при обработке домашней птицы, накапливаются в окружающей среде и представляют одну из значительных угроз экосистеме вследствие их устойчивости к процессам биологического разложения. Эта устойчивость кератинов к биодеградации обусловлена особенностью их структуры, которая характеризуется плотно упакованными суперспирализованными  $\alpha$ -спиральными ( $\alpha$ -кератин) и  $\beta$ -складчатыми ( $\beta$ -кератин) пептидными цепочками, скрепленными перекрестными сшивками в виде дисульфидных связей.

В настоящее время в Республике Беларусь нет общепринятого способа утилизации отходов птицефабрик и мясоперерабатывающих предприятий. До 2000-х гг. потенциально ценное сырье зачастую сжигалось или же перерабатывалось методом гидролиза в котлах Лапса. Данная технология не только стара, энергоемка и низкопроизводительна, но еще сопровождается вредными выбросами в окружающую среду. Сегодня в большинстве своем отходы выбрасываются на близлежащие территории или вывозятся на поля. Такие свалки являются причиной возникновения различных человеческих заболеваний, включая хлороз, микоплазмоз, птичью холеру и различные дерматофитные инфекции. Вместе с тем достигнут высокий уровень мировых и отечественных разработок в области создания новых технологий комплексной утилизации пухо-перьевого сырья и других малоценных отходов птицеперерабатывающей промышленности. Так, ключевыми подходами к переработке кератинсодержащих отходов являются кислотный гидролиз, щелочной, гидротермический и ферментативный гидролиз.

Однако, общепринятые приемы ликвидации кератиносодержащих отходов, такие как сжигание, закапывание в грунт и химический гидролиз трудоемки, потребляют много энергии, не экологичны и разрушают некоторые эссенциальные аминокислоты [3]. По сравнению с другими методами, у разложения кератина микроорганизмами есть огромные преимущества, поскольку это – экологичный и сравнительно простой метод [4]. Тем не менее, недостатком ферментативных процессов деструкции кератина является сравнительно высокая стоимость кератиназ. Одним из возможных подходов для ее снижения является применение рекомбинантных сверхпродуцентов этих ферментов.

Кератиназы, специфично гидролизующие кератиноподобные белки, отличаются устойчивостью к деградации обычными протеолитическими ферментами, и гораздо в меньшей степени – в отношении комплекса щелочных протеаз, необходимых для гидролиза растительных белков. В свою очередь микроорганизмы, обладающие кератинолитической активностью, представляют потенциал для биотехнологий.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось изучение возможности создания рекомбинантного бактериального штамма *Escherichia coli*, продуцирующего высокоактивную кератиназу.

Ген *kerA*, кодирующий кератиназу, был получен методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиду, содержащую синтетически синтезированный ген кератиназы, и встроено в вектор pET42a(+).

Система pET, к которой относится вектор pET42a(+), является самой оптимальной, разработанной для клонирования и экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli*. Целевые гены встраивали в pET-плазмиды, где они находятся под контролем промотора, полностью зависящего от наличия T7-РНК-полимеразы в клетке. Синтез T7-РНК-полимеразы можно индуцировать с помощью ИПТГ.

Управлять экспрессией нужного гена в плазмиде и нарабатывать белок можно добавлением индуктора в растущую культуру бактерий. Следуя рекомендациям фирмы-производителя данного вектора («Novagen», США), индукцию лучше всего проводить приблизительно в середине экспоненциальной фазы роста культуры при  $\lambda=600$  нм 0,6–1,5 о.е. и концентрации ИПТГ 0,5мМ.

Для получения рекомбинантного штамма-продуцента кератиназы на первом этапе методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиду, содержащую синтетически синтезированный ген целевого белка, получили

ген *kerA*, кодирующий кератиназу. В результате была получена ДНК, содержащая ген *kerA*. На 5'-окончание прямого и обратного праймера были добавлены нуклеотидные последовательности, комплементарные к плазмиде pET42a(+) («Addgene», США).

Аmplification проводили в растворе объемом 50 мкл, содержащем 1 ед Pfu-ДНК-полимеразы (производство Института микробиологии НАН Беларуси), смесь четырех канонических дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ, каждого в концентрации 0,2 мМ), по 25 пмоль прямого и обратного праймеров, 0,1 мкг ДНК.

На втором этапе линеаризовали вектор pET42a(+) методом ПЦР с использованием праймеров pET42linF-2(r) и 42Int\_R.

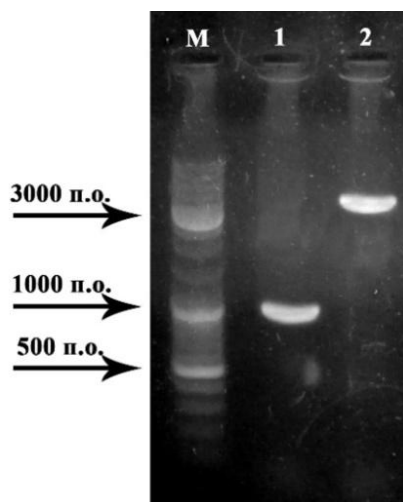
Все полученные продукты ПЦР-амплификации подвергали электрофоретическому разделению в 1 % агарозном геле (рисунок 1).

Из рисунка 1 видно, что размер амплифицированного участка соответствует теоретически рассчитанному с использованием пакета программ TotalLab TL120 (964 п.о.).

Далее при помощи полученных ранее гена и линейного вектора проводили постановку ПП-ПЦР [5]. Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3). Для определения наличия плазмиды, содержащей целевую «вставку», часть одиночной колонии отбирали при помощи стерильного наконечника и вносили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl-буфер (рН 8,3), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,02 % Твин-20, смесь четырех канонических дНТФ (каждого в концентрации 0,2 мМ), 10 пмоль праймера KerA\_R и 1 ед Pfu-ДНК-полимеразы и 1 ед T7-promoter. ПЦР проводили по следующей программе: этап начальной денатурации 2 мин при 98 °С; 25 циклов амплификации: 5 сек при 98 °С; 5 сек при 55 °С; 20 сек при 72 °С; финальная элонгация 20 сек при 72 °С.

Микроорганизмы культивировали в колбах Эрленмейера различного объема (0,25–1,0 л) на термостатированных биологических шейкерах с частотой колебания платформы 170–190 об/мин при 37 °С.

Для культивирования клеток *E. coli* использовали среду LB с добавлением соответствующего антибиотика (канамицин).



М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК (здесь и далее)

Рис. 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *kerA* (1) и коммерческого вектора pET42a(+)

ДНК, изолированную из выросших колоний бактериальных клеток, далее подвергли ПЦР-анализу для подтверждения наличия в ДНК целевого гена в правильной ориентации. Для этого использовали праймеры к последовательности T7-промотора и к последовательности, кодирующей кератиназу. Полученные результаты ПЦР-анализа представлены на рисунке 2.

Из данной электрофореграммы следует, что только в одной из двух колоний присутствует ген *kerA* в правильной ориентации, которая была выбрана для дальнейшей работы.

Колонии, имеющие вставку гена, кодирующий кератиназу, были пересеяны на питательную среду LB и использованы для синтеза целевого белка. Микроорганизмы культивировали в колбах Эрленмейера различного объема (0,25–1,0 л) на термостатированных биологических шейкерах с частотой колебания платформы 170–190 об/мин при 37 °С. Для культивирования клеток *E. coli* использовали среду LB с добавлением соответствующего антибиотика (канамицин).

На следующем этапе работы проводили препаративное выращивание клеток бактерий и выделение целевого белка. Для этого были использованы ранее подобранные условия: штамм *E. coli* p42-*kerA*: среда LB, время индукции синтеза целевого белка 3–4 ч. Клетки культивировали до оптической плотности 0,6 о.е. ( $\lambda=600$  нм), проводили индукцию синтеза белка добавлением в колбу ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали выращивание в течение 4 ч. По истечению времени, клетки центрифугировали при следующих условиях: 5 мин, при 10 000 г и 4 °С.

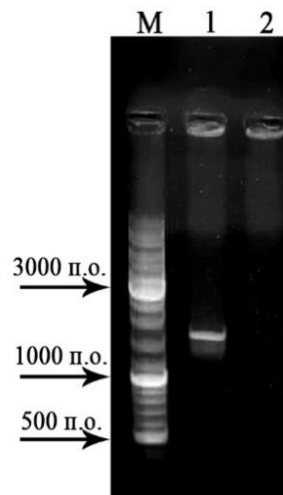


Рис. 2 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК, изолированной из клеток-трансформантов

Полученный супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 100 мл лизирующего буфера. Для подтверждения экспрессии целевого белка в клеточных культурах проводили ДСН-полиакриламидный гель-электрофорез. Денатурирующий гель-электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле по методу Лэмли с использованием 4% концентрирующего и 8% разделяющего гелей. В образец белка добавляли буфер следующего состава: 1 М Трис-НСl-буфер (рН 8,8); додецилсульфат натрия (ДСН); 20% глицерин; 0,2 М дитиотреитол, прогревали в течение 5 мин при 100°C и вносили в лунки геля. По окончании электрофореза гели окрашивали при помощи красителя Кумасси R-250 в течение 30 мин при 40°C. Избыток красителя, не связавшегося с белком, отмывали дистиллированной водой.

Полученные результаты представлены на рисунке 3.

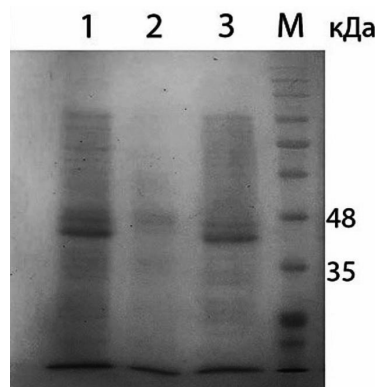


Рис. 3 – Электрофорез в полиакриламидном геле: 1 - *E. coli* BL21 (DE3) pET42.kerA (лизат); 2 - *E. coli* BL21 (DE3) pET42.kerA (надосадок); 3 - *E. coli* BL21 (DE3) pET42.kerA (осадок); М – маркер.

Целевой белок находится в нерастворимой фракции (телах включения), однако активности в ней не наблюдалось. Для концентрирования и очистки рекомбинантной кератиназы использовали колонку с Ni-NTA агарозой. Для этого клеточный лизат центрифугировали на ультраскоростной центрифуге при 60 000 g в течение 30 мин, для освобождения от телец-включения. Полученные тельца включения отмывали 8 М мочевиной в течение 12 ч. Супернатант после центрифугирования тел включения, обработанных 8 М мочевиной, наносили на колонку со смолой Ni<sup>2+</sup>-NTA и проводили промывку смолы для удаления примесных компонентов. Первый, отмывочный буфер, содержащий 2 М натрий хлорид, служил для отмывки от нуклеиновых кислот и других не целевых клеточных компонентов. Второй, промывочный буфер, служил для промывки колонки от предыдущего буфера с большей концентрацией соли. Третий, элюирующий буфер, служил для проведения элюции целевого белка со смолы. Белок элюировали 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 300 мМ NaCl и 500 мМ имидазол. Этот метод элюции помогает лучше отмыть колонку и получить более чистую фракцию целевого белка.

Протеазная активность составила 2,2 ед/мл ферментного препарата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Переработка вторичного кератинсодержащего сырья и получение белковых гидролизатов на пищевые и кормовые цели / А.Ю. Полетаев [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 7–12.
2. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration / B. Wang [et al.] // Progr. Mater. Sci. – 2016. – Vol. 76. – P. 229–318.

3. Подосокорская, О. А. Переработка отходов птицефабрик: современные подходы и перспективы / О.А. Подосокорская // Электронный научный журнал Курского государственного университета. 2017. № 3. С. 1–7.

4. Quan J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // PloS ONE. 2009. V. 4, № 7. P. 6441–6442.

5. Green MR. Molecular cloning. A laboratory manual. Fourth edition / M.R. Green, J.Sambrook // Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. – 2012. – 630 p.

## ОСОБЕННОСТИ ОСЛОЖНЕНИЙ ПЕРИОДА БЕРЕМЕННОСТИ И ПОСЛЕРОДОВЫХ СОСТОЯНИЙ

### FEATURES OF COMPLICATIONS OF THE PERIOD OF PREGNANCY AND POSTNATAL CONDITIONS

**Ю. В. Нечаева, Н. А. Козелько**

**Y. V. Nechaeva, N. A. Kozelko**

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск Республика Беларусь  
fomenok75@mail.ru*

*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

Результаты проводимого исследования показали, что среди женщин, состоящих на диспансерном учете женской консультации УЗ «Борисовская ЦРБ» наиболее часто регистрируемыми являются инфекции мочеполовых путей (26,9–32,3%). Часто регистрируются анемия (16,3–18,2%) и венозные осложнения (8,5–14,1%). Меньше всего из рассматриваемых осложнений в III триместре распространен сахарный диабет (5,2–5,4%). Кровотечения в послеродовом и послеродовом периоде за 2016–20 гг. были в 11,7% случаев.

В результате анализа динамики состояния здоровья женщин, ставших на диспансерный учет в ЖК «Борисовская ЦРБ» за период 2016–20 гг. установлено, что динамика осложнений периода беременности и послеродового периода характеризуется выраженной устойчивой тенденцией к снижению ( $R^2 > 0,7$ ).

The results of the study showed that among women attending the antenatal clinic “Borisov Central District Hospital”, urinary tract infections (26.9–32.3%) are the most frequently recorded. Anemia (16.3–18.2%) and venous complications (8.5–14.1%) are often recorded. Least of all of the considered complications in the third trimester is diabetes mellitus (5.2–5.4%). Bleeding in the follow-up and postpartum period for 2016–20 was 11.7% of cases.

As a result of the analysis of the dynamics of the health status of women registered with the dispensary in the residential complex “Borisovskaya CRH” for the period from 2016–20, it was found that the dynamics of complications during pregnancy and the postpartum period is characterized by a pronounced steady downward trend ( $R^2 > 0.7$ ).

*Ключевые слова:* беременность, заболевание, осложнение, послеродовый период.

*Keywords:* pregnancy, disease, complication, postpartum period.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-304-307>

Одним из важнейших факторов, влияющих на будущее здоровье ребенка, является состояние здоровья его матери. Осложнения периода беременности и послеродовых состояний являются современной проблемой медицины. Практически каждая беременная женщина имеет одно какое-либо осложнение, а некоторые – целую группу [1].

Осложнения периода беременности и послеродовых состояний являются современной проблемой медицины. Практически каждая беременная женщина имеет одно какое-либо осложнение, а некоторые – целую группу.

Наиболее распространенными осложнениями гестационного периода, не считая раннего токсикоза, являются выкидыши, которыми завершается до 15–20% беременностей, и преждевременные роды (6–10%). При этом 30–80% глубоко недоношенных детей страдают инвалидизирующими заболеваниями [2].

Удельный вес беременных с осложнениями от общего числа беременностей в женской консультации УЗ «Борисовская ЦРБ» составляет 91,3%, из них 84,6% осложнений беременности появляются в третьем триместре и послеродовом периоде.

Согласно среднегодовым данным, в Республике Беларусь самыми распространенными осложнениями периода беременности и послеродовых состояний являются анемия – 28,8%, – и инфекции мочеполовых путей – 25,3%.

Согласно среднестатистическим данным, из рассматриваемых осложнений в 2016–20 гг. в ЖК УЗ «Борисовская ЦРБ» наиболее часто регистрируемыми являются инфекции мочеполовых путей (32,3%) Следующими по количеству зарегистрированных случаев являются болезни системы кровообращения (18,4%) и анемия (18,2%).