

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Василов 4

Оригинальные статьи

Гормезис и колебательные эффекты при воздействии гербицидов на токсигенную цианобактерию *Microcystis aeruginosa*.

Л.Г. Дьячкова, Э.В. Чермашенцева, Н.А. Чермашенцева 5

Изучение возможности применения комплексной коацервации в целях инкапсулирования экстрактов пребиотической направленности.

Д.Р. Зяйнитдинов, А.А. Амелькина, А.В. Битюкова, А.В. Евтеев, А.В. Банникова 11

Конструирование иммунохроматографического теста на основе моноклональных антител для выявления холерного токсина.

Е.В. Баранова, С.С. Ветчинин, А.Г. Шевяков, П.В. Соловьев, Л.В. Миронова, А.С. Пономарева, Е.А. Басов, Ж.Ю. Хунхеева, В.Д. Кругликов, Л.П. Алексеева, С.Ф. Бикетов 18

Идентификация вида бактерии, преобладающего в нефтедеградирующем сообществе микроорганизмов Балтийского моря, по гену 16S рРНК.

И.В. Пташник, Д.В. Михно, М.И. Зимица, С.А. Сухих, О.О. Бабич, Л.В. Мацкова 27

Характеристика и оценка диагностической значимости поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов к холерному токсину.

О.А. Якушева, Л.П. Алексеева, В.П. Зюзина, И.В. Архангельская, М.Э. Яговкин 37

Разработка инструкций внесения точечных мутаций в промотор гена митохондриальной альтернативной оксидазы *Arabidopsis thaliana* АОХ1а.

И.О. Вележанинов, Е.С. Белых, Е.В. Гармаш 43

Разработка и получение ветеринарного препарата на основе нуклеиновых кислот зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* и его основные характеристики.

Б.О. Роик, М.М. Наумов 49

Изучение антифунгальной активности штаммов *Bacillus subtilis* в процессе периодического культивирования.

А.И. Хомяк, А.М. Асатурова, Т.М. Сидорова, Н.А. Жевнова 55

Влияние условий культивирования на рост цианобактерии *Arthrospira platensis* и выход фикоцианина.

Д.В. Сухинов, Я.Э. Сергеева 61

Параметрическая оценка состояния бактериальных клеток, исследованных методом атомно-силовой микроскопии.

П.С. Ерохин, Н.А. Осина, Д.В. Уткин, С.П. Заднова, А.Н. Спицын, О.С. Кузнецов,
А.С. Абдрашитова 66

Страницы истории

К 100-летию со дня рождения Эдмонда Фишера — биохимика, открывшего обратимое белковое фосфорилирование.

В.С. Воробьев 72

Хроника 76

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Hormesis and oscillatory effects in the action of herbicides on the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*.

L.G. Diachkova, E.V. Chermashentseva, N.A. Chermashentseva 5

Study of the possibility of using complex coacervation in order to encapsulate prebiotic extracts.

D.R. Zayinitdinov, A.A. Amelkina, A.V. Bityukova, A.V. Evteev, A.V. Bannikova 11

Construction of an immunochromatographic test based on monoclonal antibodies for the detection of cholera toxin.

E.V. Baranova, S.S. Vetchinin, A.G. Shevyakov, P.V. Soloviev, L.V. Mironova, A.S. Ponomareva, E.A. Basov, J.Yu. Khunheeva, V.D. Kruglikov, L.P. Alekseeva, S.F. Biketov 18

Identification of the predominant bacterial species in the oil-degrading community of microorganisms of the Baltic Sea, for the 16S rRNA gene.

I.V. Ptashnik, D.V. Mikhno, M.I. Zimina, S.A. Sukhikh, O.O. Babich, L.V. Matskova 27

Characterization and evaluation of diagnostic significance of poly- and monoclonal peroxidase conjugates to cholera toxin.

O.A. Yakusheva, L.P. Alekseeva, V.P. Zyuzina, I.V. Arkhangelskaya, M.E. Yagovkin 37

Design of instructions for point mutations introducing into the mitochondrial alternative oxidase gene promoter of *Arabidopsis thaliana* AOX1a.

I.O. Velegzhaninov, E.S. Belykh, E.V. Garmash 43

Development and production of a veterinary drug based on nucleic acids of the green microalgae *Chlorella vulgaris* and its main characteristics.

B.O. Roik, M.M. Naumov 49

The research of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* strains in the periodic cultivation process.

A.I. Homyak, A.M. Asaturova, T.M. Sidorova, N.A. Zhevnova 55

Influence of cultivation conditions on the growth of cyanobacterium *Arthrospira platensis* and the yield of phycocyanin.

D.V. Sukhinov, Ya.E. Sergeeva 61

Parametric assessment of bacterial cells studied using atomic force microscopy.

P.S. Erokhin, N.A. Osina, D.V. Utkin, S.P. Zadnova, A.N. Spitsyn, O.S. Kuznetsov, A.S. Abdrashitova 66

Pages of history

Dedicated to the 100th anniversary of the birth of Edmond Fischer, a biochemist who discovered reversible protein phosphorylation.

V.S. Vorobyev 72

The chronicle 76

Rules for authors 78

К читателям

Второй номер 2020 года скомпонован из оригинальных работ. В статье Дьячковой Л.Г. и др. «Гормезис и колебательные эффекты при воздействии гербицидов на токсигенную цианобактерию *Microcystis aeruginosa*» (Государственный НИИ органической химии и технологии) тестировались гербициды оксифлуорфен и кломазон. Концентрации кломазона выше 16 мкг/мл подавляли рост цианобактерии, а оксифлуорфен тормозил рост *Microcystis aeruginosa* при всем диапазоне исследованных концентраций от 400 до 0,8 мкг/л.

В исследовании Зяйнитдинова Д.Р. с коллегами из Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова изучили возможности биотехнологической трансформации с использованием УЗ-обработки и ферментативного гидролиза овсяных отрубей в функциональные ингредиенты с антиоксидантными и пребиотическими свойствами.

Авторский коллектив — Баранова Е.В. и др. — из трех учреждений (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Иркутский и Ростовский-на-Дону НИПЧИ) разработал иммунохроматографический тест на основе моноклональных антител для выявления холерного токсина.

Пташник И.В. с соавторами (Институт живых систем Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград) выявили, что в накопительной культуре микроорганизмов вод Балтийского моря с целью нефтедеградации наиболее преобладающим таксоном является *Acinetobacter haemolyticus*.

Якушева О.А. и др. из Ростовского-на-Дону НИПЧИ осуществили оценку диагностической значимости поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов к холерному токсину.

Авторы из Сыктывкарского Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Вележанинов И.О., Белых Е.С., Гармаш Е.В.) с помощью технологий геномного редактирования предложили варианты модификаций промотора гена митохондриальной альтернативной оксидазы арабидопсиса *AtAOX1a* для изучения роли фоточувствительных цис-регуляторных элементов промотора гена в упорядочивании его экспрессии.

Роик Б.О., Наумов М.М. (Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И.И. Иванова) представили собственный способ получения ветеринарного нуклеинового препарата, экстрагированного из биомассы зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris*.

Хомяк А.И. с другими исследователями из Всероссийского НИИ биологической защиты растений (Краснодар) изучили антифунгальную активность штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 по отношению к фитопатогенным грибам рода *Fusarium* в зависимости от времени культивирования в шейкер-инкубаторах.

Сухинов Д.В., Сергеева Я.Э. (НИЦ «Курчатовский институт») исследовали влияние условий культивирования на рост цианобактерии *Arthrospira platensis* и выход фикоцианина.

Группой авторов — Ерохин П.С. и др. — из Российского НИПЧИ «Микроб» (Саратов) разработан комплекс количественных параметров для оценки морфофункциональных свойств клеток микроорганизмов I–IV патогенности (с применением атомно-силовой микроскопии).

Воробьев В.С. (ПИ РАО, Москва) подготовил юбилейную статью к 100-летию со дня рождения швейцарско-американского биохимика Эдмонда Генри Фишера, лауреата Нобелевской премии.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ГОРМЕЗИС И КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДОВ НА ТОКСИГЕННУЮ ЦИАНОБАКТЕРИЮ *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Л.Г. ДЬЯЧКОВА*, Э.В. ЧЕРМАШЕНЦЕВА, Н.А. ЧЕРМАШЕНЦЕВА

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии»,
Москва

В данной работе тестировались гербициды оксифлуорфен и кломазон в течение 10 дней. Влияние кломазона на рост и содержание в клетках *Microcystis aeruginosa* хлорофилла а, β -каротина и фикоцианина С было нелинейным по типу гормезиса. Концентрации кломазона выше 16 мкг/мл подавляли рост, тогда как при концентрациях 0,25–0,5 мкг/мл происходила стимуляция роста до 132–159% в сравнении с контролем. Содержание в клетках пигментов фотосинтеза уменьшалось при концентрациях более 3 мкг/мл, а при концентрациях менее 3 мкг/мл — увеличивалось до 149–162% по сравнению с контролем. Оксифлуорфен подавлял рост *Microcystis aeruginosa* при всем диапазоне исследованных концентраций от 400 до 0,8 мкг/л. Зависимость была нелинейной и носила колебательный характер.

Ключевые слова: гербициды, кломазон, оксифлуорфен, токсичность, рост цианобактерий, пигменты, гормезис.

Введение

Развитие промышленности и сельского хозяйства неизбежно приводит к увеличению антропогенного загрязнения поверхностных вод [2]. Загрязнение водоемов и их эвтрофирование тесно связаны между собой, при этом часто загрязнение является причиной эвтрофирования, а эвтрофирование — причиной загрязнения [17]. В эвтрофных водоемах происходит массовое развитие сине-зеленых водорослей (цианобактерий). Причиной тому является обилие в эвтрофных водоемах биогенных элементов — соединений азота, фосфора и калия [1]. Вдобавок к этому в 40–50% случаев таких «цветений» в воде накапливаются их токсичные метаболиты [16, 25], оказывающие нейро-, гепато- и дерматотоксическое действие [3, 4, 24].

В регионах с интенсивным развитием сельского хозяйства пестициды могут составлять значительную часть антропогенных загрязнений. Так, вынос пестицидов с поверхностными стоками может составлять от 5 до 16% от количества, вносимого на поля [12]. Другим источником

загрязнения поверхностных вод являются сбросные воды при возделывании риса, а также городские стоки, так как пестициды применяются в парковом хозяйстве и на городских твердых покрытиях в дозировках значительно больших, чем рекомендовано для сельского хозяйства [11]. При этом в водной среде негативное влияние пестицидов проявляется сильнее, что связано с меньшей буферностью водной экосистемы, чем наземной [7].

Поскольку пестициды — это те поллютанты, которые добавляются в окружающую среду намеренно, уровень их воздействия на окружающую среду может быть рассчитан, исходя из установленных норм применения, подвижности и разлагаемости [6]. Все пестициды, допущенные к применению в Российской Федерации, проходят обязательную процедуру государственной регистрации (приказ Минсельхоза РФ «Об утверждении Порядка государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов» № 357 от 10.06.2007). Среди требуемой для регистрации пестицида информации обязательно представляются данные о его токсичности для гидробионтов, в том числе и для водорослей. Для получения такой информации проводят исследования по общепринятым методикам. Для испытаний на водорослях применяют ГОСТ 32293-2013 «Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Испытание водорослей и цианобактерий на задержку роста» (OECD test № 201) и ФР.1.39.2007.03223 «Методика определения токсич-

© 2020 г. Дьячкова Л.Г., Чермашенцева Э.В., Чермашенцева Н.А.

* **Автор для переписки:**

Дьячкова Лариса Германовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт органической химии и технологии» (ГосНИИОХТ)

E-mail: la-ri-sa@mail.ru

ности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей». В соответствии с данными методиками тестирование занимает 72 часа.

Тем не менее множество органических веществ-поллютантов сохраняются в воде значительно дольше и при этом взаимодействуют с водной биотой. Часто такие поллютанты являются биологически активными веществами и при невысоких концентрациях приводят к гормезису. Гормезис представляет собой двухфазную, а иногда и многофазную дозозависимую реакцию организма на воздействие химического вещества, характеризующуюся периодами стимуляции и подавления различных биологических функций, таких как пролиферация, репарация, синтез метаболитов. Проявление гормезиса обусловлено наличием фенотипической пластичности в реакции организма на воздействие химического вещества. Величина ответа при стимуляции составляет 130–160% от контроля [19].

Существует уже достаточно много данных, свидетельствующих о том, что различные органические загрязнители вод при их небольших концентрациях оказывают стимулирующее воздействие на пролиферацию и синтез метаболитов водорослями. Так, антибиотики для аквакультуры флорфеникол и триамфеникол увеличивают содержание хлорофилла *a* в клетках цианобактерии *Microcystis flos-aqua* при концентрациях 0,001–1 мкг/л [28], при воздействии оксифлуорфеном (75–150 мкг/л) на природные био пленки в клетках увеличивается активность каталазы [18]. Новый биоцид пентахлорфенол, применяемый как гербицид, инсектицид и антибиотик, усиливает рост цианобактерии *Microcystis aeruginosa* при концентрации 1 мкг/л [21], нонилфенол, стойкий органический загрязнитель, применяемый как ПАВ, усиливает рост *Microcystis aeruginosa* при концентрации 0,02–0,2 мг/л и токсинообразование — при 0,02–0,5 мг/л [27], 1,2,4-триазол и изотиазолиноны увеличивают содержание в клетках цианобактерий фикоэритрина и усиливают синтез токсина микроцистина LR. Целый ряд гербицидов способен вызывать гормезис у микроводорослей [20], некоторые способны активировать выделение микроцистинов [22]. При этом развитие процессов гормезиса происходит в течение недели и более.

Следовательно, данные исследованные вещества, присутствуя в природных водах даже в небольших количествах, способны усиливать эвтрофирование водоемов и, в некоторых случаях, усиливать образование цианотоксинов. Таким образом, для оценки экологического риска важно выявлять поллютанты, способствующие

вызыванию гормезиса: необходимо увеличить время проведения тестирования на водорослях, изучать воздействие тестируемого вещества при низких концентрациях и обязательно проверять вещества на способность провоцировать токсинообразование у цианобактерий.

В настоящей работе проводилось тестирование гербицидов оксифлуорфена и кломазона на цианобактерии *Microcystis aeruginosa*, которые очень часто являются виновниками токсичных «цветений» [10, 14].

Оксифлуорфен относится к классу дифениловых эфиров и считается персистентным — период полураспада в почве от 70 до 150 дней, ПДК в воде — 0,02 мг/л. После его абсорбции в тканях растений нарушается работа протопорфириногенаксидазы, образуются свободные радикалы и в результате окислительного стресса происходит разрушение клеточных мембран [11].

Кломазон, представитель изоксазолидинонов, прекрасно растворим в воде — 1,1 г/л, и имеет низкое сродство с почвой, поэтому легко выносится с поверхностным стоком, в воде стабилен в широком диапазоне значений pH и не гидролизует, ПДК в воде — 0,01 мг/л. Воздействие кломазона пока не исследовано в полной мере, однако известно, что он ингибирует активность ацетилхолинэстеразы и каталазы и подавляет синтез ди- и тетра-терпенов, каротиноидов и хлорофилла [11, 26].

Материалы и методы

Альгологически чистая культура *Microcystis aeruginosa* (CALU–972) была получена из Коллекции культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Санкт-Петербургского государственного университета.

Выращивание культуры проводилось на среде Гиндакадля интенсивного культивирования [5] в разведении 1:10 в климатостатах при 28 °С и освещенности 4500 люкс 24 часа в сутки. Прирост культуры оценивался путем определения оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Specord S 600 (AnalyticJena A.G.) при длине волны 750 нм, а также прямым счетом клеток в камере Горяева на 7- и 10-е сутки выращивания (0,1 единица ОП соответствует 0,45 млн./мл клеток *Microcystis aeruginosa*).

Определение содержания хлорофилла *a* и β -каротина в клетках проводили по стандартной методике ГОСТ 17.1.4.02-90 [8]. Определение содержания С-фикоцианина — по методике, предложенной Первушкиным С.В. с соавторами [13], измерения проводили при длине волны 636 нм.

В тесте использовали гербицидные препараты производства «ФМРус»: «Акзифор», содержащий 240 г/л оксифлуорфена, и «Алгоритм», содержащий 480 г/л кломазона. Образцы готовили на культуральной среде методом последовательных двукратных разведений. Действие гербицидных препаратов оценивали в троекратной повторности. Статистически значимых изменений концентрации гербицидов в контрольных образцах за 10 дней в условиях культивирования не выявлено.

Расчеты проводились с использованием Microsoft Excel 2010, при статистической обработке результатов использовали t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гербицид кломазон тестировали в диапазоне концентраций от 128 мкг/мл до 0,25 мкг/мл. При этом препарат «Алгоритм» (480 г/л кломазона) разводили средой культивирования до указанных концентраций. Стартовая концентрация клеток при посеве составляла 6,5 тыс./мл. Через 7 дней культивирования проводился подсчет клеток и определение оптической плотности культуры. Клетки вырастали в контроле до 167 тыс./мл, при максимальной исследованной концентрации кломазона — до 62 тыс./мл и при минимальной исследованной концентрации — до 221 тыс./мл. Затем клетки культивировали еще 3 дня и опять проводили аналогичные измерения. При этом количество клеток в контроле составляло уже 577 тыс./мл, в культурах с минимальной исследованной концентрацией кломазона — 914 тыс./мл и в культурах с максимальной исследованной концентрацией — 52 тыс./мл.

На рисунке 1 представлены результаты измерения ОП для 7- и 10-дневных культур, приведенные к 100%. Как можно видеть на нем, рост цианобактерий при диапазоне концентраций кломазона от 16 мкг/мл до 1 мкг/мл такой же, как и в контроле. При концентрациях более 16 мкг/мл рост подавлен, а при 128 мкг/мл на десятые сутки уже происходит депопуляция. При концентрациях кломазона менее 1 мкг/мл происходит значительное усиление роста. Надо заметить, что после 7 дней культивирования величина биомассы достоверно отличается от контроля в большую сторону только при 0,25 мкг/мл кломазона (132% от контроля), а в 10-дневных культурах такие отличия наблюдаются и при воздействии 0,5 мкг/мл кломазона (132% от контроля). При этом концентрация 0,25 мкг/мл кломазона на десятые сутки дает прирост уже 159%. Таким образом, с течением времени

стимуляция роста наступает уже и при больших концентрациях кломазона.

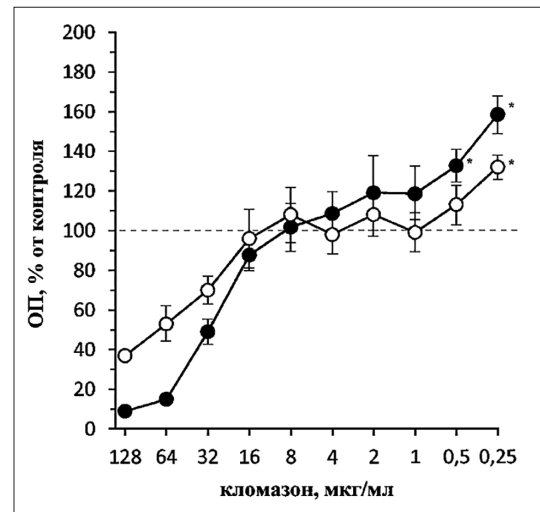


Рис. 1. Влияние кломазона на рост *Microcystis aeruginosa*. Светлые круги — 7-дневная культура, темные круги — 10-дневная культура. Пунктирной линией обозначен уровень контроля, символом (*) отмечены значения, достоверно превышающие уровень контроля ($p \leq 0,05$)

Особенно ярко этот процесс иллюстрируется на рисунке 2, где представлены зависимости содержания в клетках пигментов фотосинтеза: хлорофилла а, β -каротина и фикоцианина С — от концентрации кломазона в культуральной среде после 10 дней культивирования. Если численность клеток (ОП) в диапазоне концентраций кломазона от 16 мкг/мл до 1 мкг/мл такая же, как и в контроле, с небольшой тенденцией к повышению по мере уменьшения концентрации токсиканта, то содержание фотосинтетических пигментов в клетках в этом диапазоне концентраций резко изменяется и либо выше, чем в контроле (от 2 мкг/мл), либо заметно ниже. Так, содержание фикоцианина С на 1 миллион клеток при концентрации кломазона 0,25 мкг/мл составляет 162% по отношению к контролю, β -каротина — 156% и хлорофилла а — 149%. При этом при 16 мкг/мл содержание фикоцианина С падает до нуля, а содержание β -каротина и хлорофилла а составляет 49 и 48% от контроля соответственно; однако количество клеток сравнимо с уровнем контроля — 88% (см. рис.1). Вероятно, при концентрациях кломазона от 16 мкг/мл до 4 мкг/мл включается подавление синтеза пигментов фотосинтеза, но рост обеспечивается на уровне контроля из-за активации некоторых механизмов фенотипической пластичности, которые постепенно истощаются в течение 3 суток.

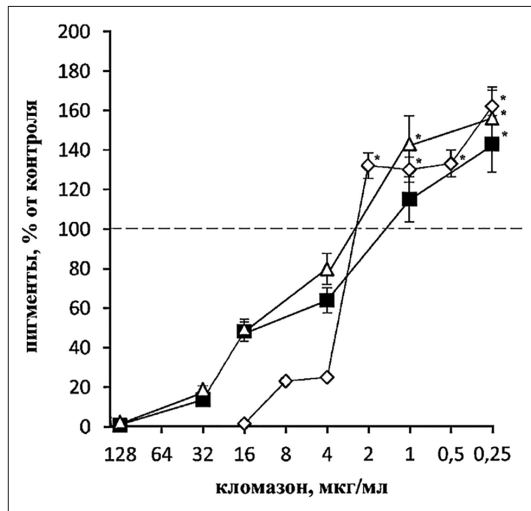


Рис. 2. Влияние кломазона на содержание пигментов фотосинтеза в клетках *Microcystis aeruginosa* после 10-дневного культивирования. Светлые треугольники — уровень β-каротина, темные квадраты — уровень хлорофилла а, светлые ромбы — уровень фикоцианина С. Пунктирной линией обозначен уровень контроля, символом (*) отмечены значения, достоверно превышающие уровень контроля ($p \leq 0,05$)

Исходя из полученных данных, можно предположить, что гормезис, вызываемый кломазоном, обусловлен повышенной выработкой фотосинтетических пигментов при низких концентрациях кломазона (от 1 до 0,25 мкг/мл), в особенности обладающих антиоксидантной активностью, таких как фикоцианин С и β-каротин.

Тестирование оксифлуорфена на *Microcystis aeruginosa* проводилось так же, как и кломазона. Оксифлуорфен оказался сильно токсичен для *Microcystis aeruginosa* — в 1000 раз более токсичен, чем для цианобактерий *Ana baena* [9].

Оксифлуорфен подавлял рост *Microcystis aeruginosa* и при концентрациях в 30 раз ниже ПДК (рис. 3), максимальная безвредная концентрация в этом исследовании не установлена. Эффективно подавляя рост, оксифлуорфен, однако, не приводил к полной элиминации цианобактерий в диапазоне концентраций от 400 до 1000 мкг/л. Рост *Microcystis aeruginosa* при воздействии оксифлуорфена представляет собой мультифазную колебательную зависимость. На 7-й день роста наблюдается пик при 100–25 мкг/л оксифлуорфена с максимальным значением 87% от контроля и пик при 6–1,5 мкг/л, что составляет 83% — различия со значениями контроля статистически незначимые. На 10-е сутки инкубирования клетки с 100–25 мкг/л оксифлуорфена утратили свой

потенциал роста, а клетки с 6–1,5 мкг/л оксифлуорфена, напротив, усилили свой рост — до 91% от контроля.

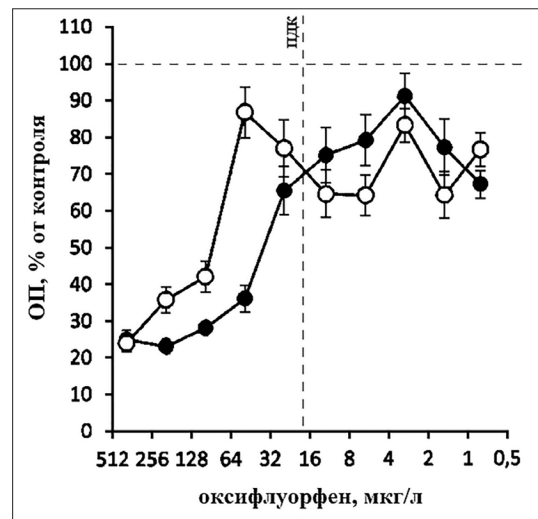


Рис. 3. Влияние оксифлуорфена на рост *Microcystis aeruginosa*. Светлые круги — 7-дневная культура, темные круги — 10-дневная культура. Пунктирными линиями обозначен уровень контроля и уровень ПДК

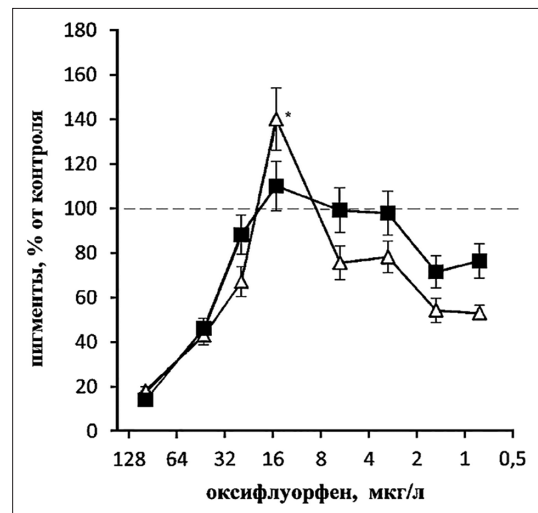


Рис. 4. Влияние оксифлуорфена на содержание пигментов фотосинтеза в клетках *Microcystis aeruginosa* после 10-дневного культивирования. Светлые треугольники — уровень β-каротина, темные квадраты — уровень хлорофилла а. Пунктирной линией обозначен уровень контроля, символом (*) отмечено значение, достоверно превышающее уровень контроля ($p \leq 0,05$)

Если обратить внимание на рисунок 4, где представлены зависимости содержания пигментов фотосинтеза от концентрации оксифлуорфена, то можно видеть, что в диапазоне концентраций 25–3 мкг/л количество хлорофилла а такое же, как и в контроле. Уровень каротина β также повышается, достигая при этом 140% от контроля

при 12 мкг/л. Следовательно, можно предположить, что усиление роста при 6–1,5 мкг/л на 10-е сутки связано с усилением синтеза хлорофилла а и, в некоторой степени, каротина-β, но несколько запаздывает по фазе. Данные по содержанию фикоцианина С на рисунке 4 не представлены, так как в исследованном диапазоне концентраций оксифлуорфен полностью подавляет его синтез.

Полученные результаты хорошо согласуются с гипотезой Ерофеевой Е.А. о механизмах фенотипической адаптации [23], согласно которой в организмах существует несколько уровней гомеостаза, каждый из которых имеет свою адаптивную емкость. Если интенсивность воздействия повреждающего фактора преодолевает некоторую адаптивную емкость и гомеостаз нарушается, то активируются дополнительные защитные механизмы и гомеостаз восстанавливается, но происходит дополнительная трата ресурсов на адаптацию. Таким образом, воздействия повреждающего фактора (оксифлуорфена) вызывают колебания параметров роста цианобактерии *Microcystis aeruginosa*, а одним из адаптивных уровней является усиление синтеза хлорофилла а и каротина-β.

Заключение

В проведенном исследовании установлено, что присутствующий в водной среде гербицид кломазон на 7–10-е сутки вызывает гормезис и усиление роста токсигенной цианобактерии *Microcystis aeruginosa* при концентрациях 0,5–0,25 мкг/мл, что можно объяснить значительным увеличением содержания пигментов фотосинтеза в клетках при этих концентрациях. Подавление роста происходит при концентрациях 32 мкг/мл и более.

Другой тестируемый гербицид — оксифлуорфен — показал высокую токсичность в отношении *Microcystis aeruginosa*, подавляя рост цианобактерии при концентрациях в 30 раз меньших ПДК. Зависимость параметров роста от концентрации оксифлуорфена носит колебательный характер. Оксифлуорфен полностью подавляет синтез фикоцианина С, при этом в диапазоне концентраций 25–3 мкг/л содержание хлорофилла а восстанавливается до уровня контроля, а при 12 мкг/л содержание каротина-β составляет 140% от контроля.

Литература

1. Анциферова Г.А., Беспалова Е.В. Состояние водной среды Воронежского водохранилища в связи с экологической ситуацией в Масловском затоне // Вестник ВГУ. Серия: География. Геоэкология. — 2016. — № 2. — С. 91–100.

2. Ашихмина Т.Я., Кутявина Т.И., Домнина У.Ф. Изучение процессов эвтрофикации природных и искусственно созданных водоемов // Теоретическая и прикладная экология. — 2014. — № 3. — С. 6–13.
3. Волошко Л.Н., Пиневич А.В. Разнообразие токсинов цианобактерий // Астраханский вестник экологического образования. — 2014. — № 1(27). — С. 68–80.
4. Волошко Л.Н. Токсины и другие биологически активные вещества, синтезируемые цианобактериями в водоемах Ленинградской области // Астраханский вестник экологического образования. — 2016. — № 1(35). — С. 28–35.
5. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей. — Уфа: БГПУ, 2008. — 138 с.
6. Горбатов В.С., Кононова А.А. Использование математических моделей прогноза концентраций пестицидов в поверхностных водах с целью оценки риска применения пестицидов для водных организмов // Агрехимический вестник. — 2010. — № 1. — С. 27–30.
7. Горбатов В.С., Филенко О.Ф., Медянкина М.В., Кононова Т.В., Оганесова Е.В. Время диктует усилить контроль. Водная экотоксикология пестицидов и современные тенденции регулирования их обращения // Вода Magazine. — 2013. — № 5. — С. 10–12.
8. ГОСТ 17.1.4.02-90 Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла а. — М.: Изд-во стандартов, 1999. — 10 с.
9. Дьячкова Л.Г., Чермашенцева Э.В. Влияние гербицидов на основе кломазона и оксифлуорфена на жизнеспособность цианобактерий *Anabaena* // Химия и технология органических веществ. — 2017. — № 4(4). — С. 70–74.
10. Калинин Т.Б., Гайнутдинов М.Х., Шагидулин Р.Р. Цианотоксины — потенциальная опасность для пресноводных экосистем и здоровья человека // Российский журнал прикладной экологии. — 2017. — № 2. — С. 3–19.
11. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения. — М.: Либроком, 2010. — 150 с.
12. Лунев М.И. Пестициды и охрана агрофитоценозов. — М.: Колос, 1992. — 106 с.
13. Первушкин С.И., Маркова И.И., Куркин В.А., Желонкин Н.Н. Разработка методик количественного определения содержания β-каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой (*Spirulina platensis*) // Фундаментальные исследования. — 2013. — № 8(часть 6). — С. 1426–1429.
14. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. Токсичные цианобактерии: распространение, регуляция синтеза токсинов, способы их деструкции // Вода: химия и экология. — 2017. — № 11–12. — С. 125–139.
15. Поляк Ю.М. Азольные соединения как фактор воздействия на массовые виды цианобактерий. // Вода: химия и экология. — 2015. — № 12. — С. 10–19.

16. Румянцев В.А., Крюков Л.Н., Поздняков Ш.Р., Жуковский А.В. Цианобактериальное «цветение» воды – источник проблем природопользования и стимул инноваций в России // *Среда обитания*. – 2012. – № 1. – С. 222–228.
17. Сиренко Д.А., Гавриленко М.Я. «Цветение» воды и евтрофирование. – Киев: Наукова думка, 1978. – 232 с.
18. Bonnineau C., Tlili A., Faggiano L., Montuelle B., H. Guasch H. The use of antioxidant enzymes in freshwater biofilms: temporal variability vs. toxicological responses // *Aquat. Toxicol.* – 2013. – Vol. 136–137. – P. 60–71.
19. Calabrese E.J., Mattson M.P. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity // *J. Cell Commun. Signal.* – 2011. – Vol. 5. – P. 25–38.
20. Cedergreen N., Streibig J.C., Kudsk P., Mathiassen S.K., Duke S.O. The occurrence of hormesis in plants and algae // *Dose Response*. – 2007. – Vol. 5. – P. 150–162.
21. de Morais P., Stoichev T., Basto M.C., Ramos V., Vasconcelos V.M., Vasconcelos M.T. Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* response to pentachlorophenol and comparison with that of the microalga *Chlorella vulgaris* // *Water Res.* – 2014. – Vol. 1(52). – P. 63–72.
22. Du Y., Ye J., Wu L., Yang C., Wang L., Hu X. Physiological effects and toxin release in *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis viridis* exposed to herbicide fenoxaprop-p-ethyl // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2017. – Vol. 24(8). – P. 7752–7763.
23. Erofeeva E.A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses // *Dose-Response*. – 2014. – Vol. 12(1). – P. 121–135.
24. Falconer I.R., Humpage A.R. Health risk assessment of cyanobacterial toxins in drinking water // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2005. – Vol. 2(1). – P. 43–50.
25. Lurling M., Oosterhout F., Faassen E. Eutrophication and warming boost cyanobacterial biomass and microcystin // *Toxins*. – 2017. – Vol. 9(64). – P. 1–16.
26. VanScoy A.R., Tjeerdema R.S. Environmental fate and toxicology of clomazone // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 2014. – Vol. 229. – P. 35–49.
27. Wang J., Xie P., Guo N. Effects of nonylphenol on the growth and microcystin production of *Microcystis* strains // *Environ Res.* – 2007. – Vol. 103(1). – P. 70–78.
28. Wang M., Zhang Y., Guo P. Effect of florfenicol and thiamphenicol exposure on the photosynthesis and antioxidant system of *Microcystis flos-aquae* // *Aquat. Toxicol.* – 2017. – Vol. 22(186). – P. 67–76.

HORMESIS AND OSCILLATORY EFFECTS IN THE ACTION OF HERBICIDES ON THE TOXIGENIC CYANOBACTERIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

L.G. DIACHKOVA, E.V. CHERMASHENTSEVA, N.A. CHERMASHENTSEVA

Scientific Research Institute of Organic Chemistry and Technology, Moscow

In this work, we tested the herbicides oxyfluorfen and clomazone within 10 days. The effect of clomazone on the growth and content of chlorophyll a, β -carotene and phycocyanin C in *Microcystis aeruginosa* cells was nonlinear in terms of hormesis. Clomazone concentrations above 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibited growth, whereas at concentrations of 0.25–0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, growth was stimulated to 132–159% compared to control. The content of photosynthetic pigments in cells decreased at concentrations greater than 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and at concentrations less than 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – increased to 149–162% compared to control. Oxyfluorfen inhibited the growth of *Microcystis aeruginosa* in the entire range of studied concentrations from 400 to 0.8 $\mu\text{g}/\text{L}$. The dependence was nonlinear and had an oscillatory character.

Keywords: herbicides, clomazone, oxyfluorfen, toxicity, growth of cyanobacteria, pigments, hormesis.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНОЙ КОАЦЕРВАЦИИ В ЦЕЛЯХ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ЭКСТРАКТОВ ПРЕБИОТИЧЕСКОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

Д.Р. ЗЯЙНИТДИНОВ, А.А. АМЕЛЬКИНА, А.В. БИТЮКОВА,
А.В. ЕВТЕЕВ, А.В. БАННИКОВА*

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов

Целью настоящей работы стало изучение возможности биотехнологической трансформации с использованием ультразвуковой обработки и ферментативного гидролиза овсяных отрубей в функциональные ингредиенты с антиоксидантными и пребиотическими свойствами. Данные свидетельствуют о преобладании в полученных ксилоолигосахаридах (КОС) из овсяных отрубей ксилотриозы и ксилотетрозы в суммарном количестве до 42,4%, что свидетельствует о выраженном пребиотическом эффекте. Изучение динамики роста *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium bifidum* подтверждает наличие пребиотических свойств КОС из отрубей овса и их селективность. Отмечено, что накопление биомассы пребиотических культур происходит быстрее с использованием ксилоолигосахаридов и лактулозы, по сравнению с молоком. Для защиты биоактивных соединений были созданы микрокапсулы путем применения технологии комплексной коацервации концентрата сывороточного белка (СБК) и мальтодекстрина (МД) с добавлением гуаровой камеди в качестве материалов для формирования стенки. Морфология капсул была изучена с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Было выявлено, что при использовании СБК и МД в соотношении 60:40 размеры частиц были наименьшими и составляли от 321 до 338 нм. Результаты показали, что использование СБК и МД в качестве материала стенки микрокапсул возможно для микрокапсулирования полифенолов и пребиотиков.

Ключевые слова: пребиотик, комплексная коацервация, сывороточный белок.

Введение

Современная концепция здорового питания предполагает увеличение пищевой ценности продуктов путем включения в их состав натуральных функциональных ингредиентов. Сбалансированные функциональные продукты питания в рационе человека не только обеспечивают организм необходимыми веществами и энергией, но также контролируют определенные физиологические функции и способствуют поддержанию здоровья путем снижения риска заболеваний [8, 13]. Вторичные продукты переработки зерна являются богатыми источниками функциональных ингредиентов, биотрансформация которых позволяет получить ряд биологически активных веществ различной химической природы с широким спектром физиологических эффектов. Антиоксиданты

зерна представляются фенольными соединениями, включающими в себя феруловую, протокатехиновую, синапиновую, ванильную, п-гидроксibenзойную и п-кумаровую кислоты и распределенными во фракциях отрубей. Большинство фенольных соединений в отрубях нерастворимо и связано эфирными связями с полисахаридами абиноксилан и лигнин в клеточной стенке [9, 10].

Помимо полифенолов, зерновые отруби содержат полисахариды ксилана, которые могут превращаться в ксилоолигосахариды (КОС) и избирательно стимулируют рост пробиотических микроорганизмов. Многочисленные исследования показали разнообразие их биологических свойств, в том числе пребиотическую, антиоксидантную и противовоспалительную активности [1, 7, 11].

Молочные белки обладают несколькими уникальными и разнообразными функциональными свойствами. В настоящее время использование молочных белков в качестве средства доставки биологически активных соединений стало новой тенденцией, которой уделяется большое внимание. Сывороточные белки представляют собой смесь глобулярных белков с переменным составом и функциональными свойствами, которые в настоящее время находят широкое применение в пищевой промышленности. За последние годы были предприняты попытки использовать сывороточный

© 2020 г. Зяйнитдинов Д.Р., Амеликина А.А., Битюкова А.В., Евтеев А.В., Банникова А.В.

* **Автор для переписки:**

Банникова Анна Владимировна
д.т.н., профессор кафедры «Технологии продуктов питания»
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет
им. Н.И. Вавилова»

E-mail: annbannikova@gmail.com

белок для контролируемой доставки биологически активных веществ [8, 15]. Тем не менее лучшая функциональность инкапсулированных белковых комплексов может быть достигнута путем комбинации белка с полисахаридами. Например, одним из наиболее часто применяемых материалов для покрытий в пищевой промышленности служит мальтодекстрин с различными эквивалентами декстрозы. Мальтодекстрин образует аморфные стеклообразные матрицы в процессе инкапсуляции, таким образом, защищая инкапсулированный материал от окисления [14, 17].

В настоящей работе была рассмотрена возможность получения полифенолов и КОС с выраженным пребиотическим эффектом из отрубей овса биотехнологическим методом с использованием ферментов-гидролаз. Кроме этого, был проведен анализ потенциала получения микрокапсул сывороточного белка — мальтодекстрина методом комплексной коацервации с целью их использования в качестве материала стенки для инкапсулирования полифенолов и КОС из отрубей овса.

Материалы и методы

Объект исследования и препараты. Овсяные отруби сорта «Тюменский голозерный» оценивались по нормативно-технической документации на их качество и безопасность.

В работе использовались ферментные препараты «Sigma Aldrich»: α -амилаза из *Bacillus subtilis* (2000 ед./г), глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* (6000 ед./г), протеаза из *Bacillus subtilis* (70 ед./г), фермент, разрушающий клеточную стенку, *Viscozyme L* из *Aspergillus* sp., лизирующий фермент из *Aspergillus* sp. с рядом активностей (β -глюканаза — 100 ед./г, ксиланаза — 50 ед./г, целлюлаза — 70 ед./г, пектинэстераза — 40 ед./г и ферулоэстераза).

Концентрат сывороточного белка (СБК) поставлялся компанией Interfood Rusmol, Новая Зеландия. Порошок содержал 77% белка, 6% углеводов, 7% жира. Мальтодекстрин (МД) был от Foodchem Ltd., Китай. Значение DE составляет 15–20, 6% влажности, рН 5%-ного раствора составляет 4,0–6,0.

Чистые культуры *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus acidophilus* были получены из музея кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Получение концентратов КОС и полифенолов: измельченные овсяные отруби обрабатывали ферментными препаратами: «Амилолюкс А» — α -амилазой (0,01% к массе отрубей) и «Глюколюкс А» — глюкоамилазой

(0,006% к массе отрубей) в ацетатном буферном растворе (рН=5), в соотношении 1:100 и гомогенизировали в течение 30 мин. Полученную суспензию подвергали термостатированию при 55 °С в течение 3,0 ч. Через 2,5 часа после начала термостатирования вносили ферментный препарат протеазы («Протосубтилин ГЗ А», 0,005% к массе отрубей). По окончании процесса гидролиза полученную суспензию нагревали до 100 ± 2 °С в течение 10 мин для инактивации ферментов. Жидкую фазу отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин. Осадок промывали три раза дистиллированной водой и снова подвергали центрифугированию. Твердый осадок подвергали ферментативному гидролизу при гидромоделе 1:10 в ацетатном буфере (рН=4) α -1,4-глюкогидролазой с амилотической активностью 4000 ед./г (ферментные препараты «Целлолюкс А», «Амилолюкс А», «Глюкаварин Г18Х»), суммарно обладающие ферулоэстеразной, гемицеллюлазной, ксиланазной и целлюлазной активностями, в течение 4,5 часов при 55 °С. По окончании экстракции ферменты инактивировали кипячением в течение 10 мин с последующим разделением фракций центрифугированием (4000 об/мин, 20 мин). Полученный таким образом супернатант концентрировали на ротационном испарителе при температуре 60 ± 5 °С до конечной влажности 30 ± 2 %, получая концентрат биологически активных веществ (БАВ) [1].

Для получения концентрата полифенолов и КОС проводили спиртовую экстракцию полученных концентратов, соотношение сиропа к этанолу (98%) — 1:3. Вследствие воздействия этанола на сироп происходят разделение фракций, растворение в водном растворе спирта фенольных соединений и осаждение КОС. Центрифугирование при 5000 об/мин. в течение 25 минут позволяет в полной мере разделить фракции двух независимых сред. Надосадочный спиртовой слой жидкости, состоящий из антиоксидантов на основе фенольных соединений, концентрировали до конечной влажности 30% и затем лиофильно высушивали до конечной влажности 8 ± 1 %.

Исследование пребиотических свойств КОС проводили согласно ГОСТ 10444.11-89 [3]. Для установления пребиотических свойств были использованы штаммы микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) и *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*). Культивирование пребиотических культур осуществляли на стандартных средах с добавлением исследуемых пребиотиков (ксилоолигосахаридов и смесь БАВ, состоящую из ксилоолигосахаридов и полифенолов), из расчета 2% массовой доли в культуральной жидкости в течение 72 часов. В качестве контроля использовали стандартную питательную среду с

добавлением лактулозы и обезжиренное молоко. Массовая доля вносимой стартерной культуры составила 2%. Определение количества клеток микроорганизма *L. acidophilus* проводили согласно ГОСТ 10444.11-2013 [16]. Метод подсчета клеток микроорганизма *B. bifidum* осуществляли согласно МУК 4.2.999-00 [5].

Приготовление микрокапсул. 10% СБК растворяли в дистиллированной воде при осторожном магнитном перемешивании при 60~80 °С в течение 30 минут до полного растворения. 10% МД растворяли в дистиллированной воде при слабом магнитном перемешивании при 50~60 °С в течение 1 часа. СБК и МД смешивали в соотношениях 10:0, 8:2, 6:4, 4:6 и 2:8 при слабом магнитном перемешивании в течение 1 часа. 10% экстракта КОС и полифенолов затем добавляли к раствору СБК и МД в соотношении 1:10 и перемешивали с использованием магнитной мешалки (Wisestir MSH-20 D, Корея) в течение 15 минут. Затем смеси обрабатывали ультразвуком при мощности 160 Вт, частоте 20 кГц и импульсе 50% (Sonic Vibra cell USA). Для обеспечения дополнительной защиты полученных микрокапсул был внесен 0,5%-ный водный раствор гуаровой камеди (10%) при постоянном перемешивании. Микрокапсулы были лиофильно высушены до получения однородной порошкообразной массы светложелтого цвета, хранили при температуре +4 ... + 6 °С.

Изображения микрокапсул были получены в просвечивающем электронном микроскопе Zeiss Libra 120.

Результаты и обсуждение

Значения концентратов КОС при анализе методом тонкослойной хроматографии. До 80% полифенолов овса содержится в связанном состоянии с биополимерной матрицей. В результате необходимо значительное воздействие в целях разрушения этого комплекса биополимеров

и извлечения биологически активных компонентов. Биомодификация овсяных отрубей по разработанной технологии включает в себя применение ультразвука и ступенчатого ферментативного гидролиза во время экстракции. Ферментативный гидролиз имеет большое значение, поскольку считается безопасной и экологически чистой технологией, которая может успешно использоваться для делигнификации. Это выгодно в отношении сохранения структуры ксилана, особенно ацетилированных остатков ксилозы, и простоты последующей очистки с минимальным воздействием на окружающую среду, а также для использования в пищевой промышленности [10].

Как уже говорилось, КОС является продуктом гидролиза ксилана и субстратом для бактериальной популяции толстой кишки, что характеризует их как потенциальный пребиотик. Ферментация КОС производит короткоцепочечные жирные кислоты, улучшает состояние кишечного эпителия и регулирует обменные процессы. Эти олигосахариды обладают связанными фенольными веществами, включая феруловую кислоту, кумаровую кислоту, что придает дополнительный антиоксидантный эффект и иммуномодулирующую активность [9, 17].

Фракционный состав полученных концентратов КОС анализировали методом тонкослойной хроматографии по значению R_f использованных метчиков (табл. 1). Анализ выявил присутствие в концентратах КОС ди-, три-, тетра- и пентаксилоолигосахаридов. Полученные данные свидетельствуют о преобладании в препаратах КОС из овсяных отрубей ксилотриозы и ксилотетрозы в суммарном количестве до 42,4%. Из литературных источников известно, что углеводные олигомеры ксилана вызывают значительный пребиотический эффект среди прочих ксилоолигосахаридов, что делает их интересным объектом с точки зрения применения как самостоятельного компонента для пищевых продуктов.

Таблица 1

Качественный анализ фракционного состава концентратов КОС из овсяных отрубей.

Значение показателя R_f углеводов

Качественный состав. Ксилоолигосахариды	Значение R_f		
	Гидротермический метод	Химический метод	Ферментативный метод
Ксилоза	0,51	0,56	0,53
Ксилобиоза	0,53	0,52	0,56
Ксилотриоза	0,40	0,38	0,41
Ксилотетроза	0,28	0,30	0,33
Ксилопентоза	0,34	0,31	0,29

Для характеристики пребиотических свойств были использованы *L. acidophilus* и *B. bifidum*. Выращивание пребиотических культур проводили на стандартных средах с добавлением исследуемых пребиотиков (КОС и концентрат БАВ) из расчета 2% в течение 72 часов. В качестве контроля использовали стандартную питательную среду с добавлением лактулозы и обезжиренного молока.

Как видно из рисунка 1, активный рост *L. acidophilus* и *B. bifidum* наблюдался в течение первых 48 часов культивирования. В последующие 24 часа наблюдалось небольшое накопление микробной биомассы, что отражает начало стационарной фазы роста молочнокислых микроорганизмов. Согласно данным на рисунке 1а,

количество клеток *L. acidophilus* на среде с добавлением КОС составило $2,8 \times 10^{11}$ КОЕ/см³ на третий день культивирования. Это было на $2,4 \times 10^{11}$ КОЕ/см³ больше, чем количество колоний, выращенных на обезжиренном молоке. При дальнейшем культивировании количество клеток *L. acidophilus* не увеличивалось. Количество колоний *B. bifidum* на третий день культивирования на среде с добавлением КОС составило $1,9 \times 10^{11}$ КОЕ/см³, концентрата БАВ — $1,0 \times 10^{11}$ КОЕ/см³, что превышает на $1,7 \times 10^{11}$ и $8,5 \times 10^{10}$ КОЕ/см³, соответственно, количество колоний, выращенных на обезжиренном молоке (рис. 1б). Дальнейшее культивирование не выявило увеличения биомассы *B. bifidum*.

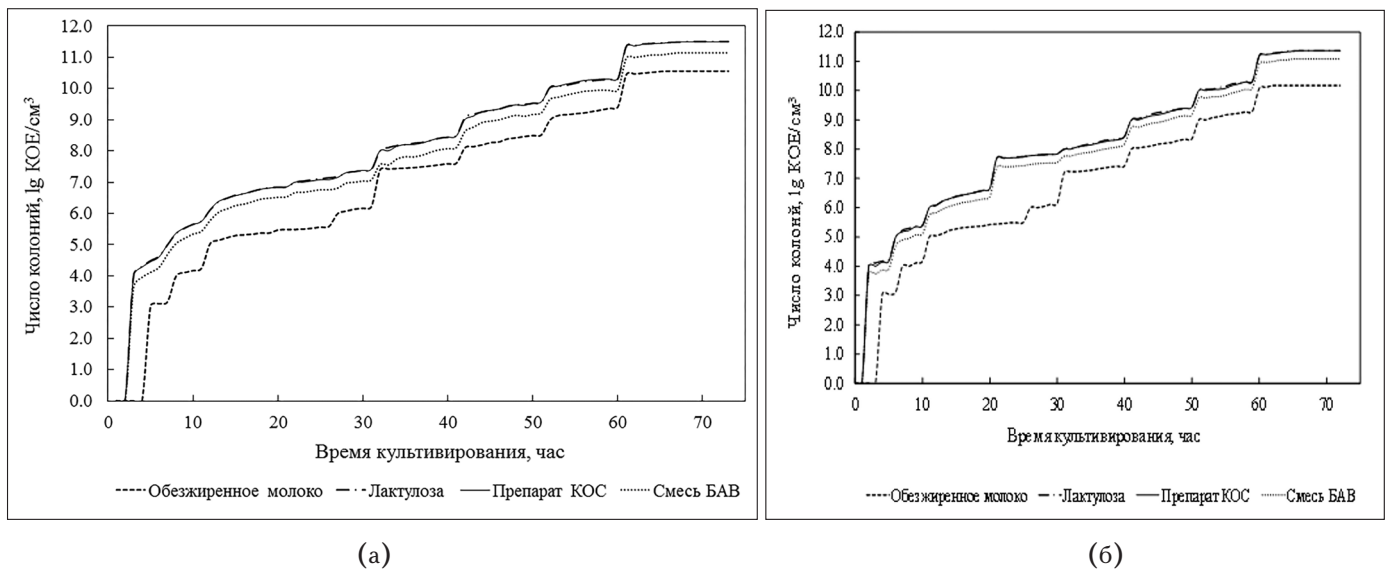


Рис. 1. Динамика роста микроорганизма (а) *L. acidophilus* и (б) *B. bifidum* при культивировании на различных средах: № 1 — обезжиренное молоко, № 2 — лактулоза, № 3 — препарат КОС, полученный ферментативным методом, № 4 — смесь БАВ

Отмечено, что накопление биомассы пребиотических культур происходит быстрее при использовании питательных сред с КОС и лактулозой, по сравнению с молоком. Более низкая активность культур при использовании концентрата БАВ связана с более низкой концентрацией КОС в нем. Таким образом, КОС из отрубей овса оказывает значительное стимулирующее влияние на рост пребиотических культур. Выявлено, что число клеток *L. acidophilus* и *B. bifidum*, выращенных на среде с добавлением КОС, было сходным с таковым, наблюдаемым в случае применения известного пребиотика лактулозы.

Стабильность и эффективность биоактивных веществ, в том числе КОС и полифенолов, зависят от света, рН, температуры обработки и хранения. Микрокапсулирование служит одним из известных методов,

которые используются для повышения стабильности и срока годности фенольных соединений. Известно, что инкапсулирование защищает необходимый компонент от неблагоприятных факторов окружающей среды [8, 16, 19, 20]. В этой связи на следующем этапе исследования будет рассмотрен процесс инкапсуляции биологически активных экстрактов из отрубей овса с использованием комплексов белок-мальтодекстрин.

Инкапсуляция экстрактов полифенолов и КОС из отрубей овса методом комплексной коацервации комплексов СБК — МД. Передовые технологии для успешного использования биологически активных веществ в пищевой промышленности направлены на применение многофункциональной технологии инкапсуляции. Реальным преимуществом инкапсуляции является способность поддерживать высвобождение включенных

ингредиентов и доставлять их для конкретной цели в течение определенного времени и в определенных условиях. В биомедицинском и фармацевтическом секторе многие синтетические полимеры были успешно использованы в качестве систем доставки, которые не применимы в пищевой промышленности [14, 16].

В новых технологических решениях белок молочной сыворотки получил широкий интерес в этом отношении благодаря своим функциональным свойствам. Предпочтения использования белка молочной сыворотки включают в себя способность контролировать скорость высвобождения малых молекул с изменением рН через карбоксильные и аммониевые группы в полипептидных цепях, которые регулируют свои протоны до кислой или нейтральной среды [15].

Ассоциативные взаимодействия между противоположно заряженными макромолекулами белков и полисахаридов в определенных условиях сопровождаются самопроизвольным расслоением системы на две жидкие фазы: фазу с высокой плотностью, обогащенную обо-

ими биополимерами (коацерват), и ее супернатант. Основную движущую силу этого процесса, называемого комплексной коацервацией, представляют электростатические взаимодействия. Важным аспектом применения комплексной коацервации является инкапсулирование пищевых ингредиентов и лекарственных веществ: образующаяся в водной смеси биополимеров коацерватная фаза способна обволакивать диспергированные в той же системе микрочастицы вещества непрерывной тонкой пленкой, которая становится твердой на стадии выделения микрокапсул. В этом исследовании мы применяем комплексную технологию коацервации СБК и МД в комбинации с гуаровой камедью для получения микрокапсул с экстрактом полифенолов [4, 12, 18].

В целях выявления комплексообразования между СБК и МД была использована просвечивающая электронная микроскопия. Кроме этого, данный метод позволяет идентифицировать, пригодно ли соотношение СБК и МД в качестве материала стенки капсул для инкапсулирования полифенолов и КОС (рис. 2).

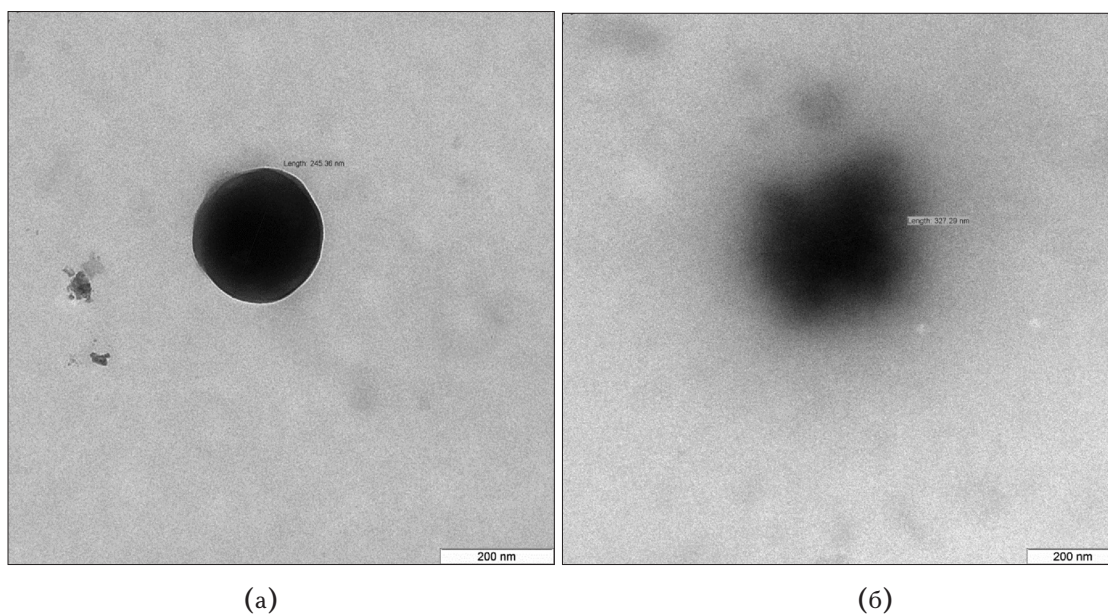


Рис. 2. Микрофотографии в просвечивающем электронном микроскопе лиофилизированных микрокапсул при соотношении СБК/МД (а) 60/40, (б) 40/60

Изображения частиц капсул показывают, что капсулы имеют правильную и ровную форму. Было выявлено, что материал стенок микрокапсул при соотношении СБК и МД, составляющем 60:40, демонстрировал наименьший диаметр частиц (от 321 до 338 нм). Результаты показали, что использование СБК и МД в качестве материала стенки микрокапсул возможно для микрокапсулирования полифенолов и КОС, и это согласуется с результатами, полученными ранее [8, 15, 16, 19, 20].

Заключение

Было рассмотрено потенциальное применение вторичного зернового сырья в качестве источника биологически активных соединений, таких как полифенолы и КОС. Динамика роста *L. acidophilus* и *B. bifidum* на среде, содержащей концентрат КОС, подтверждает наличие пребиотических свойств и их селективность. В целях защиты от условий окружающей

среды и увеличения срока хранения были получены микрокапсулы с полифенолами и КОС из отрубей овса с использованием технологии комплексной коацервации. Подтверждено, что СБК, полученный из молочной сыворотки, которая считается отходом производства сыра, является подходящим материалом для инкапсуляции полифенолов и КОС. Таким образом, была подтверждена возможность биотехнологии для превращения овсяных отрубей в функциональные ингредиенты, что в дальнейшем позволит использовать их в новых стратегиях рецептур с бифидогенными свойствами.

Работа выполнена при содействии гранта Президента РФ для поддержки молодых ученых докторов наук МД-1551.2020.11.

Литература

1. Битюкова А.В., Амелькина А.А., Евтеев А.В., Банникова А.В. Разработка технологии получения фитовеществ из вторичных продуктов переработки зерна // Техника и технология пищевых производств. — 2019. — №1 (49). — С. 5–13.
2. ГОСТ 10444.11-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов.
3. ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов».
4. Деркач С.Р., Воронько Н.Г., Маклакова А.А., Кондратюк Ю.В. Реологические свойства гелей желатины с к-каррагинаном: роль полисахарида // Коллоидный журнал. 2014. — Т. 76. — № 2. — С. 164–170.
5. Методические указания МУК 4.2.999-00 Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах.
6. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции.
7. Bannikova A., Bituykova A., Amelkina A., Evteev A., Vorobieva D., Evdokimov I. Advanced technology of oat bran biotransformation into functional ingredients // Journal of Hygienic Engineering and Design. — 2019. — Vol. 28. — P. 51–60.
8. Bannikova A., Rasumova L., Evteev A., Evdokimov I. & Kasapis S. Protein-loaded sodium alginate and carboxymethyl cellulose beads for controlled release under simulated gastrointestinal conditions // International Journal of Food Science and Technology. — 2017. — Vol. 52(10). — P. 2171–2179.
9. Carvalho A.F.A., Neto P.O., Silva D.F., & Pastore G.M. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis // Food Research International. — 2013. — Vol. 51(1). — P. 75–85.
10. Chandra Rajak R., & Banerjee R. Enzymatic delignification: An attempt for lignin degradation from lignocellulosic feedstock // RSC Advances. — 2015. — Vol. 5(92). — P. 75281–75291.
11. Contini M., Baccelloni S., Massantini R., & Anelli G. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature // Food Chemistry. — 2008. — Vol. 110. — P. 659–669.
12. Derkach S.R., Ilyin S.O., Maklakova A.A., Kulichikhin V.G., Malkin A.Ya. The rheology of gelatin hydrogels modified by kappa-carrageenan // LWT – Food Science and Technology. — 2015. — Vol. 63(1). — P. 612–619.
13. Fratiannia F., Cozzolino A., Granesea T., Albanese D., Di Matteo M., Zaccardelli M., Coppola R., & Nazzaro F. Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy) // Journal of Functional Foods. — 2014. — Vol. 7. — P. 551–557.
14. Kasapis S. Phase separation in biopolymer gels: A low- to high-solid exploration of structural morphology and functionality // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2008. — Vol. 48. — P. 341–359.
15. Panyogai N., Bannikova A., Small D.M., Shanks R.A., Kasapis S. Diffusion of nicotinic acid in spray-dried capsules of whey protein isolate // Food Hydrocolloids. — 2016. — Vol. 52. — P. 811–819.
16. Paramita V.D., Bannikova A. & Kasapis S. Release mechanism of omega-3 fatty acid in kappa-carrageenan/polydextrose undergoing glass transition // Carbohydrate Polymers. — 2015. — Vol. 126. — P. 141–149.
17. Saenz C., Tapia S., Chavez J. & Robert P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) // Food Chemistry. — 2009. — Vol. 114. — P. 616–622.
18. Sofronova A.A., Evstafyeva D.B., Izumrudov V.A., Muronetz V.I., Semenyuk. P.I. Protein – polyelectrolyte complexes: Molecular dynamics simulations and experimental study // Polymer. — 2017. — Vol. 113. — P. 39–45.
19. Soliman E.A., El-Moghazy A.Y., Mohy El-Din, M.S. & Massoud M.A. Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity // Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences. — 2013. — Vol. 3. — P. 48–55.
20. Ursache F.M., Andronoiu D.G., Ghinea I.O., Barbu V., Ionitã E., Cotãrlet M., Dumitrascu L., Botez E., Rãpeanu G., Stãnciuc N. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products // Journal of Food Engineering. — 2018. — Vol. 219. — P. 16–24.

STUDY OF THE POSSIBILITY OF USING COMPLEX COACERVATION IN ORDER TO ENCAPSULATE PREBIOTIC EXTRACTS

D.R. ZAYINITDINOV, A.A. AMELKINA, A.V. BITYUKOVA, A.V. EVTEEV, A.V. BANNIKOVA

N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

The aim of this work was to study the possibility of biotechnological transformation using ultrasonic treatment and enzymatic hydrolysis of oat bran into functional ingredients with antioxidant and prebiotic properties. The data indicate the predominance of xylotriose and xylotetrose in the obtained xylooligosaccharides (XOS) from oat bran in a total amount of up to 42.4%, which indicates a pronounced prebiotic effect. The study of the growth dynamics of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* confirms the presence of prebiotic properties of XOS from oat bran and their selectivity. It is noted that the accumulation of biomass of prebiotic cultures occurs faster with the use of xylooligosaccharides and lactulose, in comparison with milk. To protect bioactive compounds, microcapsules were created by applying the technology of complex coacervation of whey protein concentrate (WPC) and maltodextrin (MD) with the addition of guar gum as wall forming materials. The morphology of the capsules was studied using a transmission electron microscope. It was found that when using WPC and MD in a ratio of 60:40, the particle sizes were the smallest and ranged from 321 to 338 nm. The results showed that the use of WPC and MD as a material for the wall of microcapsules is possible for microencapsulation of polyphenols and prebiotics.

Keywords: prebiotic, complex coacervation, whey protein.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

Е.В. БАРАНОВА^{1*}, С.С. ВЕТЧИНИН¹, А.Г. ШЕВЯКОВ¹, П.В. СОЛОВЬЕВ¹,
Л.В. МИРОНОВА², А.С. ПОНОМАРЕВА², Е.А. БАСОВ², Ж.Ю. ХУНХЕЕВА²,
В.Д. КРУГЛИКОВ³, Л.П. АЛЕКСЕЕВА³, С.Ф. БИКЕТОВ¹

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора,
п. Оболенск, Московская область;

²ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»;

³ФКУЗ «Ростовский научно-исследовательский противочумный институт»

Получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к холерному токсину. Пара моноклональных антител использована при разработке иммунохроматографического теста для прямого определения холерного токсина. Исследована возможность применения разработанного теста для выявления продукции токсина различными штаммами холерного вибриона при их культивировании на искусственных питательных средах.

Ключевые слова: холерный токсин, *V. cholerae*, гибридомы, моноклональные антитела, иммунохроматографический тест.

Введение

Холера — особо опасное антропонозное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом заражения, протекающее как острая кишечная инфекция с диарейным синдромом. Из регистрируемых ежегодно 3–5 млн случаев заболеваний холерой около 100000 заканчиваются летально. По официальным данным ВОЗ, за период седьмой пандемии холеры зарегистрировано более 9 млн случаев холеры в мире. Возбудителем холеры является холерный вибрион O1 и O139 серогрупп, способный продуцировать один из наиболее значимых в развитии диареи факторов патогенности — холерный токсин. Вместе с тем существуют нетоксигенные варианты холерного вибриона, достаточно широко распространенные в поверхностных водоемах. Стоит особо отметить скорость развития болезни без надлежащей терапии — иногда от момента появления первых симптомов до летального исхода проходит всего около 12 часов [24].

Для Российской Федерации эпидемическая обстановка по холере в обозримом будущем прогнозируется неустойчивой, что обусловлено риском завоза инфекции из эндемичных или неблагополучных по холере стран [4]. В случае возникновения очага холеры его локализация требует неотложного начала противоэпидемических мероприятий, ошибочное или несвоевременное проведение которых может привести к существенному экономическому ущербу и человеческим жертвам. В Российской Федерации диагностика холеры регламентируется МУК «Лабораторная диагностика холеры» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и включает в себя семь этапов последовательных пересевов со сред накопления на селективные среды, общей продолжительностью 48 часов. В соответствии с данными методическими указаниями эпидемическая значимость изолированной культуры холерного вибриона должна определяться комплексным методом (оценка гемолитической активности в пробе Грейга и чувствительность к диагностическим холерным фагам СТХ⁺СТХ⁻) или на основании детекции генов, кодирующих холерный токсин (ХТ) и токсинорегулируемые пили — *ctxAB* и *tcpA* в ПЦР, а также определение токсигенности на модели кроликов-сосунков. На настоящее время применявшиеся для выявления токсичности ХТ *in vivo* модели (на кроликах-сосунках и перевязанной петле тонкой кишки взрослого кролика) [2, 8]

© 2020 г. Баранова Е.В., Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Соловьев П.В., Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Хунхеева Ж.Ю., Кругликов В.Д., Алексеева Л.П., Бикетов С.Ф.

* Автор для переписки:

Баранова Евгения Владимировна

к.м.н., ФБУН ГНЦ ПМБ

E-mail: baranova@obolensk.org

практически вытеснены более простыми и дешевыми *in vitro* тестами на культурах клеток Vero, CHO, HeLa [1].

Ранее определение ХТ в культуральной жидкости (КЖ) после культивирования штаммов холерного вибриона проводили с помощью различных вариантов иммунологических тестов, таких как реакции агрегат-гемагглютинации, пассивного иммуногемолиза, коаггутинации, иммунофлуоресцентного анализа с люминесцирующей холерной антитоксической сывороткой [5]. В последние десятилетия все чаще применяют иммуноферментный анализ как в классическом сэндвич варианте на моносиалганглиозиде GM1, так и с использованием мембран клеток CHO в качестве твердой фазы, что позволяет обнаруживать ХТ с чувствительностью от 1 нг/мл [3]. Разработаны (однако еще не внедрены в практику) биосенсоры различных типов, обеспечивающие аналитическую чувствительность до пикограммового уровня [9, 18, 21, 28]. С помощью некоторых биосенсоров удастся выявлять ХТ на аттомольном уровне [16]. Мультиплексная система «хМАР» для одновременного определения шести бактериальных токсинов, разработанная в Институте биоорганической химии РАН Симоновой М.А. и соавт., выявляла до 0,02 нг/мл ХТ в молоке [22].

В настоящее время предлагаются косвенные методы определения токсигенности, основанные на обнаружении генетических детерминант ХТ с помощью методов амплификации, изотермической амплификации [13] и полногеномного секвенирования [12, 14, 15, 17]. Однако их постановка требует достаточно много времени, подготовленного персонала и хорошо оснащенной лаборатории [7]. Кроме этого, в ряде ситуаций прямое выявление токсина остается предпочтительным, поскольку отмечается высокий уровень мутаций в локусе *ctx*, которые могут привести к ложноотрицательным результатам [23].

Актуальным направлением разработки современных диагностических препаратов представляется создание экспресс-тестов для детекции возбудителей инфекций на основе мембранного иммунохроматографического анализа [27]. Легкость и быстрота постановки таких тестов, наряду с отсутствием необходимости в оборудовании, открывают возможность использования их «у постели больного» (Point of Care, POC) или в полевых условиях для оперативного реагирования на эпидемическую угрозу [20].

Для детекции ХТ за рубежом относительно недавно были разработаны ИХ-тесты, но они практически недоступны для отечественных специалистов [26]. В

патенте № 2583306, выданном ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», описаны моноклональные антитела (моноАТ) 2E5, способные связываться с В-субъединицей ХТ. Также в работе [22] описана пара моноАТ F3H3/B1F8 для детекции ХТ в формате «хМАР». Однако возможность применения этих антител в ИХ-тестах не изучена.

В связи со сложной эпидемиологической обстановкой в отдельных странах Африки, Азии, Америки и возможностью заноса патогена в РФ существует потребность национальной системы надзора в тестах для прямого и быстрого обнаружения холерного токсина, в частности, в образцах из окружающей среды и испражнений пациентов с подозрением на холеру [6]. Поэтому нами была предпринята попытка разработать и внедрить в практику отечественный иммунохроматографический тест для выявления ХТ. В настоящей работе исследована возможность применения опытных образцов теста для выявления продукции токсина различными штаммами холерного вибриона при их культивировании на искусственных питательных средах.

Материалы и методы

Микроорганизмы. В работе использовали штаммы микроорганизмов из музеев живых культур Иркутского НИПЧИ, Ростовского НИПЧИ, Государственной коллекции микроорганизмов ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ). Штаммы холерного вибриона были выделены от больных или из объектов окружающей среды и охарактеризованы по культуральным, морфологическим, серологическим, биохимическим свойствам. Все использованные штаммы были проверены на наличие генов *ctxAB*, *tcpA*.

В качестве контрольных микроорганизмов использовали: *V. cholerae* не O1/O139 № 1-09, *V. cholerae* не O1/O139 № 1-10, *V. cholerae* не O1/O139 № 1-11, *V. parahaemolyticus* 110, *V. metschnikovii* № 15, *Y. pseudotuberculosis* 27, *Y. enterocolitica* И-76, *S. dysenteriae* 401-I, *S. dysenteriae* 243, *E. coli* 52, *E. coli* 06H16 ETEC, *S. typhimurium* № 14. Культивирование контрольных микроорганизмов проводили в бульоне LB.

Работу с патогенными штаммами проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Культивирование холерных вибрионов проводили на щелочном агаре (рН 7.6) при 37 °С в течение 18 ч. Выросшие колонии пересеивали (одна стандартная бактериологическая петля диаметром 3 мм) в 5 мл среды

АКІ и инкубировали при 37 °С в стационарных условиях в течение 3 ч. Далее 0,5 мл культуры пересеивали в 5 мл среды АКІ и инкубировали при 37 °С с шуттелированием в течение 6 ч.

Реактивы и материалы. В работе использовали питательные среды: щелочной агар (ТУ 9385-039-78095326-2008, ГНЦ ПМБ, Россия), LB агар, среда АКІ (Himedia, Индия). Компоненты 1 и 2 среды АКІ смешивали в пробирке в равных объемах (по 5,0 мл) непосредственно перед засеивом культуры холерного вибриона (Компонент 1: NaCl — 12,5 г, дрожжевой экстракт — 10,0 г, бакто-пептон — 37,5 г, дистиллированная вода до 1,25 л. Компонент 2: NaHCO₃ — 7,5 г, дистиллированная вода до 1,25 л). В работе использовали: набор реактивов для экстракции ДНК (Fermenats, Латвия), ДНК-полимеразу Prime STAR (Takara, Япония), праймеры к T7-промотору и T7-терминатору (TAG, Дания), набор ИХ-тестов изотипирования моно-АТ IsoQuick (Sigma-Aldrich), сорбент для аффинной очистки моноАТ MabSelectA (GE Healthcare, Швеция), натрий-фосфатный буфер (НФБ) (ПанЭко, Россия), нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм (Amersham, Protran, Германия).

Все химические реагенты аналитической чистоты производства Sigma-Aldrich (если дополнительно не указано иное) применяли без дополнительной очистки. Растворы готовили на деионизованной воде (18,2 МОм), полученной на установке Simplicity (Millipore, США).

Для конструирования ИХ-тестов в формате «deep stick» использовали материалы производства «Advanced Microdevices» (Индия): нитроцеллюлозную мембрану пористостью 8 мкм на подложке TYPE-CNPF-SN12-L2-N50; стекловолоконный фильтр TYPE-PT-R5; сорбирующую подушечку TYPE-GFB-R4(0.35); поглощающую подушечку TYPE-AP 045.

Получение рекомбинантной В-субъединицы холерного токсина. Выделение хромосомной ДНК клеток *V. cholerae* 569В проводили с помощью набора для экстракции ДНК в соответствии с инструкцией производителя. Праймеры для амплификации гена *ctxB* подбирали на основе базы данных NCBI (номер доступа GenBank U25679). Для последующей вставки в плазмиду рЕТ-28а в последовательность добавили сайты рестрикции *HindIII* и *XhoI*. Последовательности прямого и обратного праймеров приведены ниже:

Прямой праймер 5'—ATTAAGCTTCCATGAT-TAAATTAAAATTTGG—3'

Обратный праймер 5'—ATCCTCGAGATTT-GCCATACTAATTGCG—3'

Амплификацию проводили в объеме 25 мкл, содержащем по 0,6 пМоль каждого праймера, 1,5 Мм MgCl₂, 0,2 мМ смеси нуклеотидов, 2,5 единицы ДНК-полимеразы, 2,5 мкл буфера ПЦР и 300 нг хромосомной ДНК при следующих условиях: 94 °С (6 мин), 30 циклов по 60 с на 94 °С, 60 с на 55 °С и 60 с на 72 °С, с дополнительной инкубацией 5 мин при 72 °С; продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Ампликон экстрагировали с помощью набора High Pure PCR Purification Kit (Roche, Германия), обрабатывали рестриктазами *HindIII* и *XhoI*, после чего лигировали в экспрессионную плазмиду рЕТ-28а. Полученным вектором трансформировали клетки *E. coli* компетентного штамма DH5α. Селекцию клонов проводили на чашках с LB агаром, содержащим 30 мкг/мл канамицина. Выросшие устойчивые клоны размножали и определяли наличие плазмиды с помощью ПЦР с праймерами к T7-промотору и T7-терминатору. Клоны, содержащие плазмиду, размножали и депонировали.

Ген В-субъединицы экспрессировали в клетках *E. coli* штамма BL-21(DE3) рLysS после трансформации плазмидой рЕТ-28а/ХТ. Культивирование проводили в жидкой среде LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина, при температуре 37 °С. После достижения оптической плотности среды значения OD₆₂₀=0,7 проводили индукцию клеток *E. coli* с использованием IPTG в конечной концентрации 1мМ и наращивали культуру при 37 °С в течение 4 часов. Клеточный осадок, содержащий рекомбинантную В-субъединицу, отделяли и отмывали НФБ от среды культивирования центрифугированием.

Получение природного ХТ. Нативный токсин получали аффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованной D-галактозой по методу Клементса и Финкельштейна [25]. Для выделения ХТ использовали ночную культуру холерного вибриона с шуттелированием в заполненных на треть колбах. После инактивации часовым прогревом до 60 °С бульон осветляли центрифугированием. Супернатант концентрировали в ультрафильтрационной ячейке с мембраной MWCO 10 кДа под избыточным давлением азота. В полученный концентрат добавляли сульфат аммония до 60% насыщения. Сформированный осадок отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме НФБ. Полученный раствор обессоливали гель-фильтрацией на колонке с сефарозой G-25. После этого проводили хроматографию на сорбенте с иммобилизованной D-галактозой. Элюцию связавшегося токсина проводили раствором 0,2 М D-галактозы в НФБ под контролем УФ-монитора. После элюции токсин диализовали против 10-кратного

объема НФБ и концентрировали на ультрафильтрационной ячейке с MWCO 10 кДа под избыточным давлением азота.

Получение моноклональных антител, специфичных к ХТ. Иммунизацию мышей линии BALB/c проводили рекомбинантной В-субъединицей ХТ. Антиген вводили подкожно в количестве 100 мкг на мышшь в полном адъюванте Фрейнда. Через 28 дней мышам подкожно вводили аналогичное количество антигена в неполном адъюванте Фрейнда. Затем через две недели антиген вводили внутривенно в количестве 10 мкг на мышшь. Гибридизацию иммунных спленоцитов и клеток мышшиной миеломы линии P3-X63-Ag8.653 проводили по стандартной методике при помощи ПЭГ 4000 [26]. Далее проводили селекцию, скрининг в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА) и клонирование гибридом. Гибридомы, продуцирующие моноАТ к ХТ, культивировали в виде асцитных опухолей с последующей очисткой моноАТ аффинной хроматографией на сорбенте MabSelectA. Определение изотипа моноАТ проводили с помощью коммерческого набора IsoQuick согласно инструкции производителя.

Определение аддитивности антител к ХТ. Полученные моноАТ биотинилировали сукцинимидным эфиром биотина по стандартной методике в соответствии с инструкцией производителя. Полученные биотиновые конъюгаты использовали для твердофазного сэндвич-ИФА. Планшеты для ИФА сенсibilizировали растворами антител в 0,1 М карбонатном буферном растворе рН 9,6 при температуре 4 °С в течение ночи. Оставшиеся места неспецифической сорбции планшета блокировали 1% раствором БСА. Далее в лунки добавляли серийные разведения культурального бульона от штамма *V. cholerae* 569В. После инкубации и промывки в лунки добавляли биотинилированные антитела в концентрации 0,5 мкг/мл. Затем в лунки добавляли конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена в рабочем разведении. После отмывки в лунки вносили раствор тетраметилбензидина. Ферментативную реакцию останавливали после развития окраски (через 15 мин) добавлением 0,5 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при $\lambda=450$ нм с помощью планшетного фотометра «Униплан» (Пикон, Россия).

Для анализа специфической активности моноАТ к ХТ использовали иммуноблот-анализ [25].

Получение конъюгата моноАТ с КЗ. Коллоидное золото (КЗ) получали восстановлением из 0,01% раствора золотохлористо-водородной кислоты 1%-ным раствором цитрата натрия [11]. Конъюгацию моноАТ с частицами КЗ проводили по авторской методике [19].

Конструирование иммунохроматографического теста. Для конструирования ИХ-тестов использовали продукцию фирмы MDI (Индия). Контрольную зону тест-полоски формировали с использованием поликлональных кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, а тестовую зону — с использованием моноАТ к ХТ. Растворы антител в НФБ наносили диспенсером IsoFlow (Imagene Technology, США) на нитроцеллюлозную мембрану в концентрации 0,5 мг/мл со скоростью нанесения 4 мм/сек и объемом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок использовали 10% глицерин, 1% БСА и 0,01% NaN_3 . Раствор золотоконъюгата наносили на стекловолокночные фильтры со скоростью 8 мм/сек в объеме 1,6 мкл/мм.

Сушку мембран и фильтров с нанесенными реагентами проводили в климатической камере (Memmert, Германия) при температуре 25 ± 2 °С и влажности 25%. Собранный мультимембранный композит нарезали на полоски с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter (A-Point Technologies, США) и упаковывали в пластиковые пробирки с помощью вакуумного упаковщика Voxel 35 (Henkelman, Голландия). Изготовленные ИХ-тесты хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

*Иммунохроматографический анализ штаммов *V. cholerae* и гетерологичных микроорганизмов.* Анализ проводили в трех повторностях. Необходимое количество ИХ-тестов выдерживали при комнатной температуре 22 ± 2 °С в течение 15 мин. Тест-полоску помещали вертикально в пробирку с бульонной культурой в объеме 0,2 мл. Инкубировали 15 минут при комнатной температуре и проводили учет результата анализа.

Результаты и обсуждение

Получение моноклональных антител к ХТ и их конъюгатов с КЗ. В результате гибридизации было получено больше 60 положительно реагирующих в ИФА гибридом. В процессе клонирования и реклонирования отобрано девять гибридом-продуцентов моноАТ к ХТ. Определение изотипов моноАТ показало, что все полученные гибридомы продуцируют иммуноглобулины подклассов IgG.

Анализ результатов иммуноблота продемонстрировал, что моноАТ, продуцируемые гибридомами А7, D9, Е6, Е11, G1 и G9, взаимодействуют с ХТ в нативной и денатурированной формах (рис. 1).

Для подбора аддитивных пар моноАТ против ХТ были конъюгированы с биотином по стандартной методике. Все возможные комбинации антител были про-

тестированы в сэндвич-ИФА. Всего было обнаружено 8 пар антител, достоверно детектирующих ХТ. Наиболее аддитивными парами из них являются пары G1-E8 и

G1-D5. Результаты ИФА для этих пар показаны на рисунке 2. Наименьший предел чувствительности для пары антител G1-E8 составил 0,2 нг/мл.

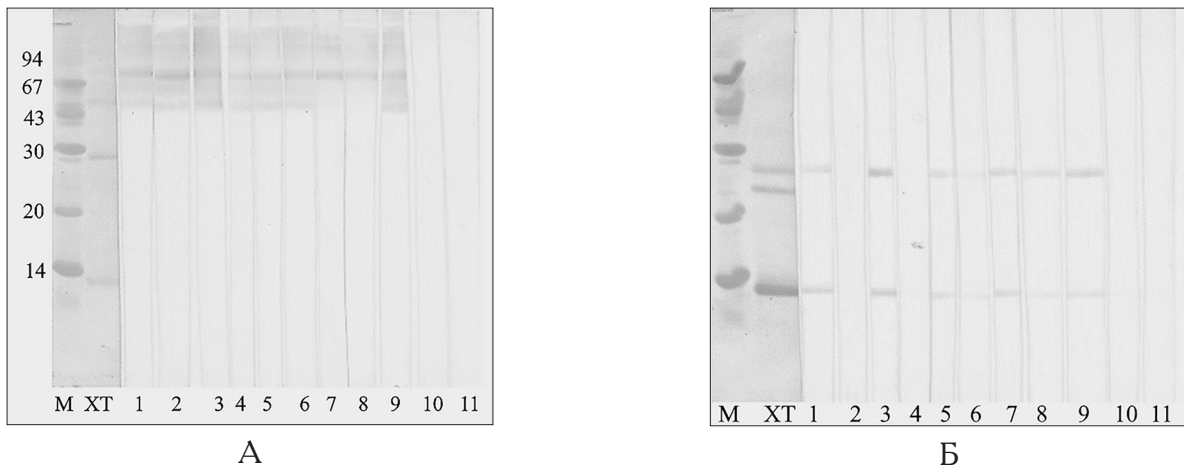


Рис. 1. Иммуноблот моноАТ против холерного токсина: а – электрофорез проведен в неденатурирующих условиях; б – электрофорез проведен в денатурирующих условиях. М – маркеры молекулярной массы (кДа), ХТ – холерный токсин, 1 – А7, 2 – D5, 3 – D9, 4 – E1, 5 – E6, 6 – E8, 7 – E11, 8 – G1, 9 – G 9, 10 – контрольные неспецифические моноАТ, 11 – НФБ

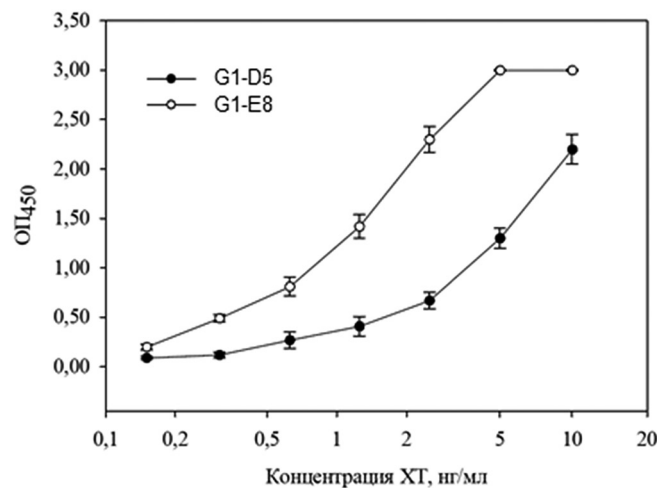


Рис. 2. Сэндвич ИФА для пар антител против холерного токсина ХТ. По горизонтальной оси отложены концентрации ХТ в нг/мл, по вертикальной оси – значения оптической плотности в лунках, соответствующие этим концентрациям

В качестве компонентов для создания иммуно-хроматографических тестов для ускоренного выявления токсигенных штаммов возбудителя холеры были отобраны два антитела к ХТ – E8 и G1, проявляющих наибольшую аддитивность в сэндвич-ИФА.

Для создания функционального иммуно-золотого конъюгата было проведено мечение отобранных моноАТ. Концентрация моноАТ, соответствующая образованию стабильного конъюгата, для моноАТ G1 составляла 6,6 мкг/мл, для моноАТ E8 – 8,8 мкг/мл.

Проверка полученных антител показала, что сочетание моноАТ G1 в тестовой зоне и моноАТ E8 в

составе золотоконъюгата обеспечивали наилучшую читаемость результата анализа (яркость и четкость тестовой и контрольной полос в ИХ-тестах). Данная пара антител была использована для наработки экспериментальных образцов теста «*V. cholerae tox+*».

Исследование опытных образцов ИХ-теста «*V. cholerae tox+*» для определения продукции ХТ штаммами *V. cholerae*. Опытные образцы теста были исследованы в лаборатории холеры Иркутского НИПЧИ и лаборатории микробиологии Ростовского-Дону НИПЧИ. При исследовании теста использовали 58 штаммов *V. cholerae*. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Результаты исследований ИХ-теста «*V. cholerae tox+*»

№ п/п	Коллекционный №	Год, место выделения	Наименование штамма (фенотип, генотип)	Результат в ИХ
1.	16063	1993, г. Азов	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+</i>	+
2.	16067	1993, Индия	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+</i>	+
3.	16489	1994, Институт Пастера	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+</i>	–
4.	Р-2	1943, СЭЛ	<i>V. cholerae classical ctxA+</i> , <i>tcpA–</i>	+
5.	27 (1769)	1963, Калькутта	<i>V. cholerae classical ctxA+</i> , <i>tcpA–</i>	+
6.	28	1966, Батуми	<i>V. cholerae classical ctxA+</i> , <i>tcpA–</i>	+
7.	251/0	1988, г. Одесса	<i>V. cholerae classical ctxA+</i> , <i>tcpA–</i>	–
8.	12214	1982, неизвестно	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i>	–
9.	17834	1998, Дагестан	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i>	+
10.	18367	2001, г. Ростов-на-Дону	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcp+</i>	+
11.	18368	2001, г. Ростов-на-Дону	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcp+</i>	+
12.	18588	2003, г. Ростов-на-Дону	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
13.	18746	2004, Республика Башкортостан	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
14.	18826	2005, Тверская область	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i> , <i>ToxR+</i>	+
15.	18847	2005, г. С.-Петербург	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
16.	1942	2012, г. Москва	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
17.	18895	2005, г. Москва	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
18.	18899	2006, г. Мурманск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	–
19.	19241	2011, г. Таганрог	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
20.	19242	2012, г. Москва	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
21.	Р-19430	2013, г. Ростов-на-Дону	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–
22.	Р-19435	2013, г. Ростов-на-Дону	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–
23.	Р-19547	2013, Элиста	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–
24.	19550	2013, Элиста	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–
25.	19566	2013, Элиста	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–
26.	16063	1993, г. Азов	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+</i>	+
27.	16067	1993, Индия	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+</i>	+
28.	16489	1994, Институт Пастера	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+</i>	–
29.	И-475	1972, г. Омск	<i>V. cholerae</i> El Tor O1 <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	–
30.	И-561	1973, г. Барнаул	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	–
31.	И-576	1973, г. Новосибирск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
32.	И-1181	1994, г. Новосибирск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
33.	И-1187	1994, г. Барнаул	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
34.	И-1263	1997, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
35.	И-1264	1997, г. Ачинск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
36.	И-1345	1999, г. Владивосток	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
37.	И-1324	1999, г. Владивосток	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
38.	И-1334	1999, г. Владивосток	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
39.	И-1303	1999, г. Южно-Сахалинск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
40.	И-1313	1999, г. Южно-Сахалинск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	+
41.	М-878	Нет сведений	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+</i> , <i>tcpA+</i>	–
42.	569В	1948, Пакистан	<i>V. cholerae classical ctxA+</i> , <i>tcpA–</i>	+
43.	И-145	1958, Индия	<i>V. cholerae classical ctxA+</i> , <i>tcpA–</i>	–
44.	И-1327	1999, Приморский край	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–
45.	И-1353	2000, г. Владивосток	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA–</i> , <i>tcpA–</i>	–

46.	И-1354	2000, г. Владивосток	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
47.	И-1372	2003, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
48.	150-06-B	2006, г. Владивосток	<i>V. cholerae</i> <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
49.	И-1447	2010, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
50.	И-1435	2009, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
51.	1-11	2011, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
52.	2-11	2011, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
53.	4-11	2011, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
54.	69	2011, г. Чита	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
55.	107	2011, г. Барнаул	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁺	—
56.	90	2011, г. Кемерово	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
57.	6674	2011, Иркутская область	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—
58.	И-16	2006, г. Иркутск	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA</i> ⁻ , <i>tcpA</i> ⁻	—

Анализ полученных результатов исследований показал, что из 38 взятых в исследование токсигенных штаммов *V. cholerae* с генотипом *ctxAB*⁺*tcpA*_{elt}⁺*toxR*⁺ (*V. cholerae* El Tor) и *ctxAB*⁺*tcpA*_{elt}⁻*toxR*⁺ (*V. cholerae* classical) у 29 (76,3%) обнаруживается продукция ХТ. Положительный результат ИХ-анализа показан со всеми взятыми в исследование (8 штаммов) атипичными вариантами вибриона эльтор, содержащими специфический для классического биовара ген субъединицы В ХТ (*ctxB1*). Все штаммы *V. cholerae*, изолированные из поверхностных водоемов в период эпидемиологического благополучия, не содержащие в геноме детерминант ХТ, обнаружили отрицательный результат тестиро-

вания с ИХ-тестом «*V. cholerae* tox⁺». Также отрицательный результат на наличие ХТ показан со всеми взятыми в исследование штаммами гетерологичных микроорганизмов.

Практически у всех штаммов *V. cholerae* El Tor, содержащих специфический для биовара эльтор *ctxB* ген третьего генотипа, иммунохроматографически продукция ХТ не обнаружена (отрицательный результат с тремя штаммами из четырех). Возможной причиной отрицательных результатов является низкий уровень продукции ХТ *in vitro* некоторыми штаммами с генотипом *ctxAB*⁺*tcpA*_{elt}⁺*toxR*⁺ в использованных условиях культивирования (рис. 3).




АКІ		И-475
АКІ		569B
АКІ		И-1263

Рис. 3. Результаты тестирования культуральной жидкости некоторых штаммов *V. cholerae* ХТ tox⁺ с ИХ-тестом «*V. cholerae* tox⁺»

Определение воспроизводимости анализа с использованием ИХ-теста «*V. cholerae* tox⁺» проводили двумя независимыми группами исследователей в трех повторностях для каждого микроорганизма. Для каждой группы исследователей воспроизводимость получена в 100% измерений, что, согласно «МР По порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий», воспроизводимость при доверительной вероятности 90% составляет 98%.

Проверку стабильности рабочих качеств ИХ-теста проводили с интервалом в 1 месяц на протяжении 1 года его хранения при температуре 4 °С. В течение данного срока тест не менял своих диагностических свойств.

Методом количественного ИФА установлено, что уровни экспрессии ХТ tox⁺ штаммами холерного вибриона при культивировании на жидких питательных средах варьируют от 0,1 до 100 нг/мл КЖ в зависимости от состава сред и условий культивирования. Поскольку нижний предел детекции ИХ-теста составляет 1 нг/мл, примерно у 10% tox⁺ штаммов с продукцией токсина меньше этого уровня результат тестирования будет отрицательным

Заключение

Таким образом, разработанный иммунохроматографический тест на основе пары моноклональных

антител к холерному токсину может использоваться для быстрой бесприборной идентификации большинства токсигенных штаммов возбудителя холеры. Для преодоления псевдоотрицательных результатов тестирования штаммов холерного вибриона на токсигенность, которые наблюдали примерно в 10% определений, необходимо понизить нижний предел определения ХТ, то есть повысить чувствительность ИХ тестов. Другими подходами для решения задачи по выявлению штаммов с низкой продукцией ХТ служат введение пробоподготовки с концентрированием токсина-мишени из КЖ или использование индукторов синтеза токсина при культивировании тестируемых штаммов.

Литература

1. Гаева А.В., Громова О.С., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А. Современные подходы к контролю активных компонентов холерной химической вакцины // Фармжурнал. — 2018. — Т. 22. — № 1. — С. 152–157.
2. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. — 87 с.
3. Михеева Е.А., Девдариани Э.Л., Осина Н.А., Щербанова С.А. Определение холерного токсина у штаммов *V. cholerae* в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител // Биозащита и биобезопасность. — 2014. — Т. 4. — № 21. — С. 38–42.
4. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Титова С.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Анисимова Г.Б. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007–2016 гг., прогноз на 2017 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2017. — № 1. — С. 13–20.
5. Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани Э.Л., Адамов А.К., Григорьева Г.В. Иммунодиагностика холеры: современное состояние проблемы // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 103. — С. 18–23.
6. Alam M., Hasan N.A., Sultana M., Nair G.B.S., Faruque A.S.G., Endtz H.R., Sack R.B., Huq A., Colwell R.R., Alam M., Hasan N.A., Sultana M., Nair G.B., Sadique A., Faruque A.S.G., Endtz H.P., Izumiya H., Morita M., Watanabe H., Cravioto A. Diagnostic limitations to accurate diagnosis of cholera // Journal of Clinical Microbiology. — 2010. — Vol. 48. — No. 11. — P. 3918–3922.
7. Awasthi S. P., Chowdhury N., Neogi S. B., Hinenoya A., Hatanaka N.C., Chowdhury G., Ramamurthy T., Yamasaki S. Development of a multiplex PCR assay for the detection of major virulence genes in *Vibrio cholerae* including non-O1 and non-O139 serogroups // Journal of Microbiological Methods. — 2019. — Vol. 157. — P. 54–58.
8. Burrows W., Musteikis G.M. Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop // The Journal of Infectious Diseases. — 1966. — Vol. 116. — No. 2. — P. 183–190.
9. Cecchini F., Fajis L., Cosnier S., Marks R.S. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2016. — Vol. 79. — P. 199–209.
10. Clements J.D., Finkelstein R.A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures // Infection and Immunity. — 1979. — Vol. 24. — No. 3. — P. 760–769.
11. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Methods for chemical synthesis of colloidal gold // Russian Chemical Reviews. — 2019. — Vol. 88. — No. 3. — P. 229–247.
12. Gubala A.J., Prohl D.F. Molecular-beacon multiplex real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — Vol. 72. — No. 9. — P. 6424–6428.
13. Izumiya H., Morita M., Arakawa E., Ngo T.C., Nguyen H.T., Nguyen D.T., Ohnishi M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for *Vibrio cholerae* O1 and O139 // Molecular and Cellular Probes. — 2019. — Vol. 45. — P. 65–67.
14. Kim E.J., Lee C.H., Nair G.B., Kim D.W. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1 // Trends in Microbiology. — 2015. — Vol. 23. — No. 8. — P. 479–489.
15. Koskela K.A., Matero P., Blatny J.M., Fykse E.M., Olsen J.S., Nuotio L.O., Nikkari S. A multiplatform real-time polymerase chain reaction detection assay for *Vibrio cholerae* // Diagnostic microbiology and infectious disease. — 2009. — Vol. 65. — No. 3. — P. 339–344.
16. Loyprasert S., Hedström M., Thavarungkul P., Kanatharana P., Mattiasson B. Sub-attomolar detection of cholera toxin using a label-free capacitive immunosensor // Biosensors & Bioelectronics. — 2010. — Vol. 25. — No. 8. — P. 1977–1983.
17. Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67. — No. 10. — P. 4685–4693.
18. Nikoleli G., Nikolelis D.P., Siontorou C.G., Karapetis S., Nikolelis M. Application of biosensors based on lipid membranes for the rapid detection of toxins // Biosensors. — 2018. — Vol. 8. — No. 3. — P. 61.
19. Oliver C. Conjugation of colloidal gold to proteins / Ed. C. Oliver, M. Jamur. Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). — Totowa, NJ: Humana Press. — 2010. — Series Volume 588. — 416 p.
20. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139 // Vaccine. — 2020. — Vol. 38. — P. A73–A82.

21. Shlyapnikov Y.M., Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84. — No. 13. — P. 5596–5603.
22. Simonova M.A., Valyakina T.I., Petrova E.E., Komaleva R.L., Shoshina N.S., Samokhvalova L.V., Lakhtina O.E., Osipov I.V., Philipenko G.N., Singov E.K., Grishin E.V. Development of xMAP assay for detection of six protein toxins // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84. — No. 15. — P. 6326–6330.
23. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kuttyrev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. — 2011. — Vol. 26. — No. 3. — P. 102–110.
24. Update: Outbreak of cholera — Haiti, 2010 // *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. — 2010. — Vol. 59. — No. 48. — P. 1586–1590.
25. Walker J.M. *The Protein Protocols Handbook* / Ed. J. M. Walker. — Totowa, NJ: Humana Press. — 2009. — LXX, 1984 p.
26. Yamasaki E., Sakamoto R., Matsumoto T., Maiti B., Okumura K., Morimatsu F., Balakrish Nair G., Kurazono H. Detection of cholera toxin by an immunochromatographic test strip // *Methods in Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 1600. — P. 1–7. doi: 10.1007/978-1-4939-6958-6_1.
27. Yamasaki E., Sakamoto R., Matsumoto T., Morimatsu F., Kurazono T., Hiroi T., Nair G. B., Kurazono H. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin // *BioMed Research International*. — 2013. — Vol. 2013. — Article ID 679038. doi: 10.1155/2013/679038.
28. Zhang C., Liu L., Liang P., Tang L., Yu R., Jiang J. Plasmon coupling enhanced Raman scattering nanobeacon for single-step, ultrasensitive detection of cholera toxin // *Analytical Chemistry*. — 2016. — Vol. 88. — No. 15. — P. 7447–7452.

Список сокращений:

ХТ — холерный токсин;

моноАТ — моноклональные антитела;

КЗ — коллоидное золото;

ИХ — иммунохроматография;

ИФА — иммуноферментный анализ;

КЖ — культуральная жидкость;

БСА — бычий сывороточный альбумин;

НФБ — 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4;

НФСБ-Т — НФСБ с 0,05% Твина-20.

CONSTRUCTION OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE DETECTION OF CHOLERA TOXIN

E.V. BARANOVA¹, S.S. VETCHININ¹, A.G. SHEVYAKOV¹, P.V. SOLOVIEV¹,
L.V. MIRONOVA², A.S. PONOMAREVA², E.A. BASOV², J. Yu. KHUNHEEVA²,
V.D. KRUGLIKOV³, L.P. ALEKSEEVA³, S.F. BIKETOV¹

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow Region;

² Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East;

³ Rostov Research Anti-Plague Institute

Hybridomas producing monoclonal antibodies to the cholera toxin were obtained. A pair of monoclonal antibodies was used in the development of a lateral flow test for direct detection of cholera toxin. The possibility of using the developed test to detect the production of cholera toxin by various strains of *Vibrio cholerae* during their cultivation on artificial nutrient media is investigated.

Keywords: cholera toxin, *V. cholerae*, hybridomas, monoclonal antibodies, immunochromatographic test.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДА БАКТЕРИИ, ПРЕОБЛАДАЮЩЕГО В НЕФТЕДЕГРАДИРУЮЩЕМ СООБЩЕСТВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ, ПО ГЕНУ 16S рРНК

И.В. ПТАШНИК*, Д.В. МИХНО, М.И. ЗИМИНА, С.А. СУХИХ, О.О. БАБИЧ, Л.В. МАЦКОВА

*Институт живых систем Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта,
Калининград*

С увеличением добычи нефти растет потребность в поиске эффективных путей защиты окружающей среды от негативного антропогенного воздействия. Микроорганизмы окружающей среды способны использовать углеводороды нефти в своем метаболизме. Поэтому поиск и изучение микроорганизмов, естественных обитателей различных экологических ниш, способных утилизировать компоненты нефти, представляется актуальной задачей. В ходе исследования была отобрана, выделена и идентифицирована накопительная культура микроорганизмов, обитающих в Балтийском море, которая может использовать компоненты нефти в качестве единственного источника углерода. Преобладающим видом в накопительной культуре оказался вид *Acinetobacter haemolyticus*. Был проведен сравнительный хроматографический анализ минеральных сред, содержащих нефть в присутствии и в отсутствие накопительной бактериальной культуры микроорганизмов. В минеральной среде с нефтью после инкубации в присутствии накопительной культуры, обогащенной *Acinetobacter haemolyticus*, были обнаружены соединения, содержащие йод, хлор и серу в своем составе, а также в два раза больше метилированных соединений, чем в среде без бактерий.

Ключевые слова: деградация нефти, *Acinetobacter*, секвенирование нового поколения.

Введение

Балтийское море омывает границы девяти стран (России, Эстонии, Латвии, Литвы, Польши, Германии, Дании, Швеции и Финляндии) и является судоходным узлом для них [20]. Прибрежная зона давно и густо заселена, а добыча нефти проводится как в открытом море, так и вблизи побережья. В последние годы уделяется повышенное внимание добыче углеводородов из трудноизвлекаемых запасов и континентального шельфа [1]. В настоящее время Балтийское море является одним из самых оживленных водных путей в мире. Он имеет около 40 портов и нефтяных терминалов. По оценкам, 9% мировой торговли и 11% мировой транспортировки нефти проходит через Балтийские воды [12]. За истекшие 10 лет в районе Балтийского моря был построен ряд новых нефтяных терминалов, что привело к увеличению транспортировки нефти на судах и, как следствие, к повышению риска аварий и возрастанию риска загрязнения морской среды, что делает

поиск путей и способов борьбы с нефтезагрязнениями этой акватории первоочередной задачей [4].

Сырая нефть и ее очищенные компоненты служат важнейшими ресурсами для экономики всех стран. Сейчас продукты переработки нефти стали универсальными источниками энергии в деятельности человека, однако их получение, транспортировка и переработка связаны с утечками и возможными авариями, приводящими к загрязнению окружающей среды [15].

В состав нефти входят как легкие фракции — насыщенные и ароматические углеводороды, так и тяжелые — полярные смолы и асфальтены. Наибольшую часть соединений, входящих в состав нефти, составляют насыщенные углеводороды, поэтому актуальна проблема их удаления. При этом ароматические углеводороды и полярные неуглеводородные компоненты более токсичны, устойчивы к биодеградации и, следовательно, представляют большую опасность для окружающей среды. Более того, углеводороды нефти, а также продукты их распада, накапливаясь в звеньях цепей питания, оказывают мутагенное и канцерогенные воздействия. Углеводороды могут быть удалены из окружающей среды с помощью различных методов, включая физические, химические, механические и биологические методы.

Большинство компонентов нефти — алканы, которые успешно подвергаются аэробной утилизации.

© 2020 г. Пташник И.В., Михно Д.В., Зими́на М.И., Сухих С.А., Бабич О.О., Мацкова Л.В.

* Автор для переписки:

Пташник И.В.

аспирант Института живых систем Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта

E-mail: iv.ptash@gmail.com

Основные пути аэробной деградации как насыщенных, так и ароматических углеводородов включают в себя добавление атомов кислорода в реакциях, проводимых ферментами оксигеназами [17]. В связи с этим аэробные популяции бактерий, обладающие этими ферментами, играют ключевую роль в рекультивации промышленных вод [14, 21]. В настоящее время известно широкое разнообразие бактериальных родов и видов, способных деградировать в аэробных условиях углеводороды нефти, включая *Brevundimonas*, *Methylocaldum*, *Xanthobacter*, *Flavobacterium* и различные члены порядка *Burkholderiales* [2].

К бактериям, окисляющим исключительно алканы, относится *Alcanivorax borkumensis*. Геном этого организма сравнили с геномом *Oleispira antarctica* и показали для последней гены, кодирующие различные монооксигеназы, осмопротектанты, сидерофоры и пути метаболизма [13].

Для устранения нефтяных загрязнений активно применяются различные способы очистки загрязнений, среди которых их разрушение с помощью бактерий представляет наиболее оптимальный с точки зрения эффективности, простоты и экономичности [3]. Бактерии, использующие углеводороды нефти в качестве источника энергии, широко распространены в окружающей среде и играют значительную роль в утилизации загрязнений нефти. Большинство углеводород-разлагающих бактерий относится к гаммапротеобактериям, в первую очередь, таким родам, как *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Thalassolituus* и *Oleibacter* [11].

В настоящей работе для идентификации микробных сообществ, деградирующих углеводороды нефти, были использованы комбинации методов молекулярной биологии, связанных с метагеномным анализом, основанным на высокопроизводительном секвенировании амплифицированных ДНК, соответствующих гену 16S рРНК, и микробиологических методов, необходимых для культивирования бактерий на средах, обогащенных сырой нефтью.

Цель нашего исследования заключалась в выделении и идентификации микроорганизмов, естественных обитателей Балтийского моря, способных разлагать углеводороды нефти.

Материалы и методы

Отбор проб

Образцы воды были отобраны в месте активного судоходного движения из поверхностного слоя при-

брежной зоны Балтийского моря (54,65° с.ш. и 19,87° в.д., район города Балтийск). Отобранные образцы прибрежной морской воды (5 литров) были транспортированы в лабораторию и профильтрованы через 0,22 мкм фильтры (Швейцария, ТРР, Vacuum Filtration «rapid»-Filtermax). Часть биомассы с фильтра использовали для выделения тотальной ДНК и профилирования по гену 16S рРНК. Оставшуюся часть биомассы использовали для культивирования микроорганизмов, деградирующих углеводороды.

Культивирование микроорганизмов

Сообщество микроорганизмов растили на модифицированной минеральной морской среде М.457 [18], содержащей Na_2HPO_4 вместо K_2HPO_4 . В качестве единственного источника углерода использовали 1% об. сырой нефти (ГОСТ 9965-76), профильтрованной от микроорганизмов с помощью 0,22 мкм фильтров. Культуру растили в течение 12 месяцев, пересеивая 1% об. бактериальной суспензии каждые два дня в свежую среду или при достижении оптической плотности среды OD_{600} 0,3–0,8 для получения бактериальной культуры, обогащенной нефть-метаболизирующими микроорганизмами. Для получения одиночных колоний пересев проводили на плотную минеральную среду М.457, содержащую 2% об. агара.

Выделение ДНК

Тотальную бактериальную ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом [16] из бактериальной культуры, обогащенной углеводород-метаболизирующими микроорганизмами.

Амплификация последовательности ДНК

Профилирование микробного сообщества проводили по участку V4 гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК различных бактериальных видов.

Амплификацию фрагментов гена, кодирующего малую субъединицу 16S рРНК, проводили методом ПЦР по конечной точке в амплификаторе T100™ Thermal Cycler (США, BIO RAD). Универсальные праймеры содержали последовательности, специфичные к V4 фрагменту гена 16S рРНК бактерий [7]:

515F (Евроген,) CAAGCAGAAGACGGCA TACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTATAGTTAGGGCTGAGTGG GTGBCAGCMGCCGCGGTAA и 806R (Евроген, AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT STTTCCSTACACGACGCTCTTCCGATCTAT AGTTAGGGCTTTCTCTGGACTACHVGGGT WTCTAAT).

Для проведения секвенирования по Сенгеру полного 16S рРНК гена использовали праймеры 27F (Евроген, AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG) и 1492R (Евроген, GGTTACSTTGTTCACGACTT).

Концентрация матричной ДНК находилась в диапазоне 1–1000 нг, конечная концентрация праймеров составляла 0,4 мкМ. При постановке ПЦР использовали реакционную смесь qPCRmix-HS (Евроген). ПЦР проводили при условиях, рекомендованных поставщиком реактивов для ПЦР (Евроген): предварительная денатурация при 95 °С – 3 мин; затем 29 циклов: денатурация при 95 °С – 30 с, отжиг праймеров при 54 °С – 15 с, элонгация при 72 °С – 3 мин. Наличие и размер ампликонов анализировали в 1%-ном агарозном геле. ПЦР-фрагмент очищали от праймеров после электрофоретического разделения в 1%-ном агарозном геле с помощью набора Cleanup Standard (ЕВРОГЕН) для последующего секвенирования.

ТА-клонирование полного 16S рРНК гена

Ампликоны, полученные в процессе ПЦР с использованием той же ДНК матрицы и праймеров 27F и 1492R, клонировали в рAL2-Т вектор согласно рекомендациям производителя (ЕВРОГЕН) и вводили в *E. coli* штамм DH5а. Бактерии, содержащие плазмиды со вставкой, отбирали в сине-белом тесте. Дополнительно плазмиды на наличие вставок проверяли в ПЦР с праймерами, специфичными к последовательностям бактериофага M13, являющимися частью рAL2-Т-вектора (Евроген) – M13F и M13R (Евроген, 5'-GTTGTA AAAACGACGGCCAGT-3' и 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'). Плазмидную ДНК, содержащую последовательности полного 16S рРНК гена, выделяли с помощью набора Cleanup Mini (Евроген).

Секвенирование ДНК

Профилирование по участку V4 гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК бактерий и полученного в ПЦР-реакции с 515F и 806R праймерами, проводили, применяя метод секвенирования нового поколения с использованием оригинального набора реактивов MiSeq Reagent Kit v3 для MiSeq прибора (США, Illumina).

На основе полученных прочтений нуклеотидных последовательностей (использовали fasta формат) создали базу данных с помощью приложения makeblastdb [5].

Полную последовательность 16S рРНК генов (1465 п.о.) определяли в ходе секвенирования по Сенгеру на 3500 Genetic Analyzer (Япония, HITACHI) с использованием набора – Набор BrilliantDye™ Terminator, v 3.1 (США, ThermoFisher).

Газово-хроматографический и масс-спектрометрический (ГХ/МС) анализ

Идентификацию метаболитов в минеральной среде, содержащей нефть, после культивирования в ней накопительной бактериальной культуры в течение 36 часов при 30 °С и при 15 °С, проводили с помощью ГХ/МС Agilent 5977А прибора с масс-спектрометрическим детектором MSD 5977 В. Колонка – 5 MS 30 м, газ носитель – He, скорость газа носителя – 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1 мкл, режим ввода – с делением потока, соотношение деления – 100:1, температурный градиент – от 70 градусов до 250 градусов Цельсия, скорость – 20 град/мин. Параметры настройки MS: режим детектирования положительных ионов, диапазон сканирования – 70–550 Мz, мощность источника ионов – 77 eV, усиление ФЭУ 15.00. Хроматограмма была получена по общему ионному току. Была использована библиотека масс-спектров для идентификации соединений NIST 14.

Подготовку проб осуществляли как описано в ранних статьях [19, 22]. Экстракцию метаболитов проводили из водной фазы с помощью гексана. Негативными контролями в тесте служили абиотические контроли – это минеральная среда М.457 с 1% об. нефти в минеральной среде без бактерий и без инкубации в течение 36 часов.

Определение субстратной специфичности бактериальной культуры

Накопительную культуру микроорганизмов культивировали в течение 36 ч при 30 °С в присутствии одного из следующих веществ: глюкозы, галактозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, маннита, мочевины, адипиновой и лимонной кислот, добавленных в концентрации 1,5 М, а также крахмала и желатина в концентрации 40 г/л. Способность утилизировать субстрат оценивали с помощью спектрофотометра (США, BIO RAD, SmartSpec Plus Spectrophotometer) по изменению оптической плотности (OD₆₀₀).

Результаты

Анализ базы данных, полученной после секвенирования амплифицированных V4 участков гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК различных бактериальных видов, представлен на рисунке 1. Каждой полосе на графике соответствует отдельный таксон. Первоначально (рис. 1.1) с помощью профилирования сообщества по гену 16S рРНК удалось идентифицировать более 630 таксонов, из которых 48% принадлежало к семейству *Proteobacteria*. Спустя 12 месяцев пересевов в нефтедеградирующем сообществе осталось

около 5 таксонов, на которые приходится наибольшее количество прочтений: от 11 до 4568, преобладающий из которых (74,2%) — род бактерий *Acinetobacter* (рис.

1.2 и 1.3). Оставшиеся 25,8% прочтений пришлись на роды бактерий: *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* и *Xanthobacteraceae*.

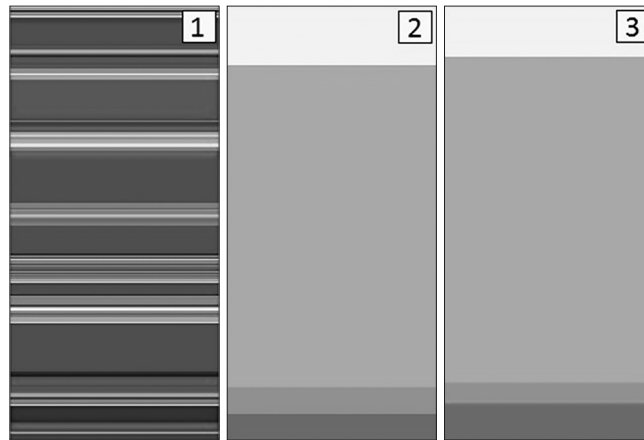


Рис. 1. Профилирование бактерий Балтийского моря по участку V4 гена, кодирующего 16S субъединицу рибосомальной РНК бактерий (1) исходного сообщества микроорганизмов и (2) и (3) накопительной культуры, обогащенной нефтедеградирующими бактериями, спустя 12 месяцев в двух повторах

Было проведено секвенирование по Сенгеру полного гена, кодирующего 16S субъединицу бактериальной рРНК, для определения видовой принадлежности бактерий, преобладающих в сообществе нефтедеградирующих микроорганизмов Балтийского моря.

В итоге были получены два перекрывающихся прочтения нуклеотидных последовательностей, суммарно покрывающие полный ген (см. Дополнительные материалы, рис. 4).

Полученные результаты были обработаны с помощью статистической программы компонента Vector NTI Advance 9.1.0 — ContigExpress.

Данные анализа соответствия прочитанной последовательности полного гена, кодирующего 16S рРНК бактерий, известным последовательностям базы данных NCBI BLASTN, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Таблица микроорганизмов, имеющих наиболее высокие показатели соответствия прочитанной нуклеотидной последовательности известным последовательностям полного гена 16S рРНК из базы данных

Организм	Степень покрытия	Степень идентичности	Номер доступа
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> strain ATCC 17906	99%	99,09%	NR 117622.1
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909	99%	98,43%	NR 117624.1
<i>Acinetobacter bouvetii</i> strain DSM 14964	99%	97,91%	NR 117628.1
<i>Acinetobacter colistiniresistens</i> strain NIPH 1859	99%	97,91%	NR 157606.1
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> strain DSM 14971	99%	97,72%	NR 117629.1
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> strain DSM 6962	95%	99,04%	NR 026207.1
<i>Acinetobacter oleivorans</i> strain DR1	99%	97,06%	NR 102814.1
<i>Acinetobacter tandoii</i> strain DSM 14970	99%	97,07%	NR 117630.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain ATCC 23055	99%	97,07%	NR 117619.1
<i>Acinetobacter pittii</i> DSM 21653 strain ATCC 19004	99%	97,00%	NR 117621.1

Таким образом, на основании сравнения степени покрытия и степени идентичности анализируемой ДНК с показателями, представленными в базе данных Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), было высказано предположение о том, что исследуемая культура представлена видом *A. haemolyticus*.

Был проведен сравнительный хроматографический анализ питательных сред, содержащих 1% об. нефти в

присутствии накопительной бактериальной культуры после 36 ч. инкубации при 30 °С (биотический образец) (рис. 2.1) и минеральной среды М.457 с 1% об. нефти в отсутствие бактериальной культуры и без инкубации (абиотический контроль) (рис. 2.2). Целью ГХ/МС анализа были выявление и идентификация метаболитов, образуемых в биотическом образце в присутствии нефти как единственного источника углерода.

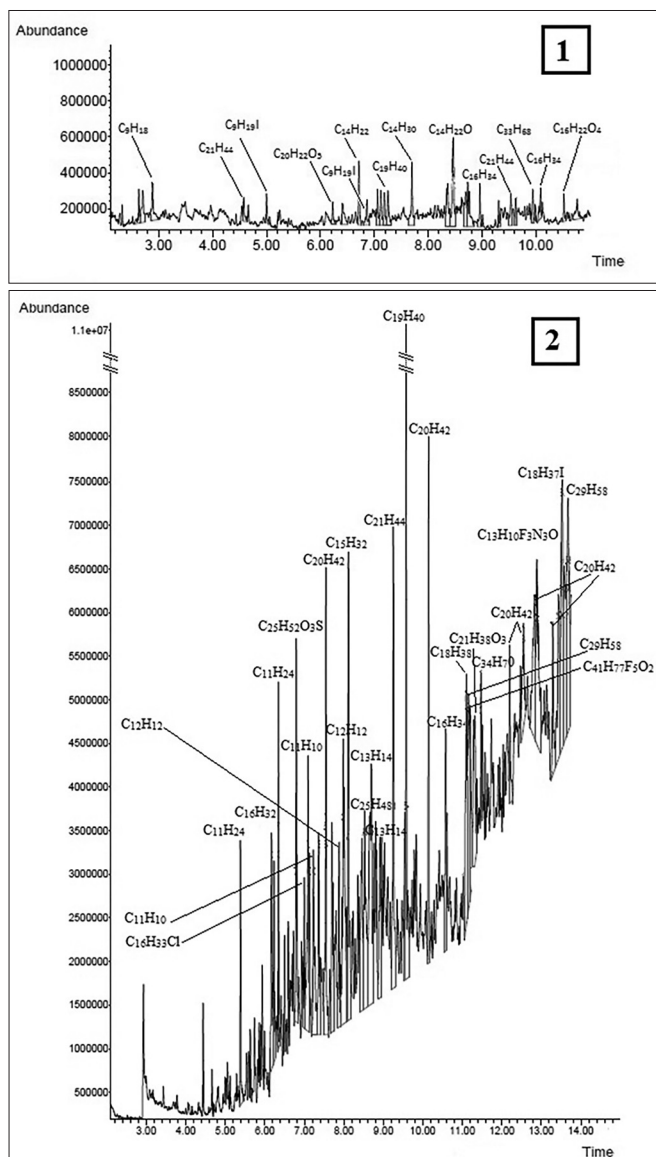


Рис. 2. ГХ/МС хроматограмма минеральной среды М.457 с сырой нефтью в качестве единственного источника углерода, после культивирования в ней накопительной культуры при 30 °С (1) и минеральной среды М.457 с сырой нефтью, без внесения накопительной культуры (2)

В минеральной среде (см. Дополнительные материалы), содержащей нефть и инкубированной в присутствии микроорганизмов при оптимальной температуре для этой бактерии (Ncbi taxonomy [https://bacdiv.dsmz.de/strain/8092]) – (30 °С) отсутствует большинство неразветвленных, линейных, алканов (C₈–C₂₄), за исключением ундекана (C₁₁H₂₄), октадекана (C₁₈H₃₈) и эйкозана (C₂₀H₄₂). Отсутствует более легкая фракция алканов (<C₁₁). Это может свидетельствовать о том, что данные соединения были утилизированы сообществом микроорганизмов в накопительной культуре. В то же время при более низкой температуре, соответствующей

температуре воды в Балтийском море, в 15 °С, в минеральной среде было обнаружено значительно больше линейных алканов, характерных и для абиотического контроля. Это может быть объяснено неоптимальными условиями культивирования, препятствующими расщеплению линейных цепей углеводов нефти.

Интересно, что снижение температуры культивирования биотических проб не сказалось на наличии полиароматических соединений. Они присутствовали в биотических пробах в отличие от абиотических контролей, где ароматические соединения содержали только один цикл. В таблицах 2.1–2.4 (см. Дополнительные материалы) указаны соединения, которые были идентифицированы в процессе ГХ/МС анализа с помощью библиотеки масс-спектров NIST 14, с указанием молекулярной формулы и типа соединения.

Метилированные алканы содержались как в биотических, так и в абиотических пробах. В биотических образцах было отмечено наличие хлор-, йод-, фосфор-, азот- и серосодержащих соединений, а также ряд сложных соединений, представляющих собой эфиры различных кислот, или соединения, содержащие многочисленные атомы фтора, хлора или азота.

Далее была проведена оценка субстратной специфичности бактериальной культуры (рис. 3) на основе анализа значений оптической плотности бактериальной культуры, растущей при 30 °С на различных субстратах: углеводородных, углеводных, мочевины и некоторых органических кислот. Мы исходили из того, что способность бактериальной культуры расти на выбранном субстрате в течение 36 часов свидетельствует о способности микроорганизмов метаболизировать данный субстрат.

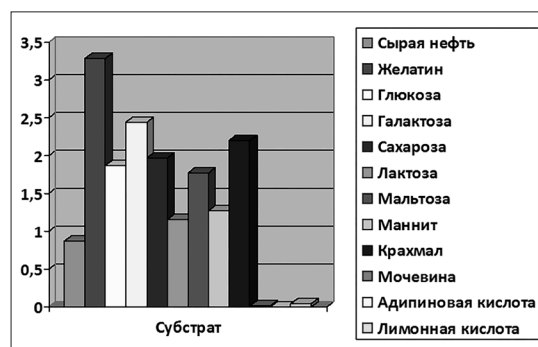


Рис. 3. Зависимость показаний оптической плотности (OD₆₀₀) бактериальной культуры от типа субстрата

Было проведено сравнение оптической плотности бактериальной культуры, растущей в присутствии или компонентов нефти или в присутствии моно- и полисахаридов, мочевины и некоторых кислот. В присутствии

адипиновой ($OD_{600}=0,003$), лимонной ($OD_{600}=0,044$) кислот и мочевины ($OD_{600}=0,008$) рост бактериальной культуры отмечен не был. Наибольший рост был отмечен при выращивании сообщества в присутствии желатина ($OD_{600}=3,281$), галактозы ($OD_{600}=2,442$) и крахмала ($OD_{600}=2,201$). Сообщество показало умеренный рост в присутствии сахарозы ($OD_{600}=1,973$), глюкозы ($OD_{600}=1,872$), мальтозы ($OD_{600}=1,776$) и маннита ($OD_{600}=1,268$) и лактозы ($OD_{600}=1,152$).

При культивировании микроорганизмов в присутствии сырой нефти оптическая плотность составила 1,776.

Как следует из приведенных данных, накопительная бактериальная культура, обогащенная штаммом *Acinetobacter haemolyticus*, способна расти и размножаться в присутствии сырой нефти, хотя и с меньшей эффективностью, чем в присутствии углеводов.

В заключение приводятся Дополнительные материалы к представленной основной части статьи.

Дополнительные материалы

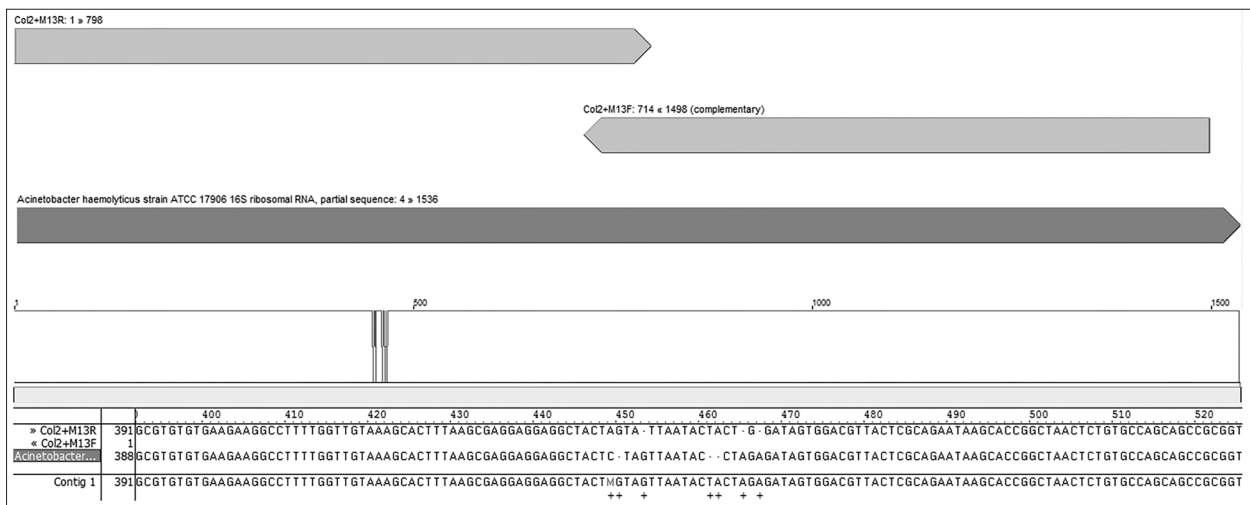


Рис. 4. Результаты секвенирования проб по Сенгеру

При секвенировании полного гена 16S рибосомальной субъединицы были получены две перекрывающиеся последовательности ДНК, 795 и 724 пар нуклеотидов соответственно. Последовательности, полученные при секвенировании с

помощью праймеров M13F и M13R, на 99,09% идентичны последовательности *Acinetobacter haemolyticus*. Поэтому микроорганизм, которому принадлежат полученные фрагменты ДНК, был отнесен к *Acinetobacter haemolyticus* виду.

Таблица 2.1

Соединения, идентифицированные в процессе ГХ/МС анализа (алканы)

Молекулярная формула	Название	Абиотический контроль	Биотический образец, 30 °С	Биотический образец, 15 °С
C_8H_{18}	Октан	+		
C_9H_{20}	Нонан	+		
$C_{10}H_{22}$	Декан	+		
$C_{11}H_{24}$	Ундекан	+	+	+
$C_{12}H_{26}$	Додекан	+		
$C_{13}H_{28}$	Тридекан	+		+
$C_{14}H_{30}$	Тетрадекан	+		+
$C_{15}H_{32}$	Пентадекан	+		+
$C_{16}H_{34}$	Гексадекан	+		+
$C_{17}H_{36}$	Гептадекан	+		
$C_{18}H_{38}$	Октадекан	+	+	+
$C_{19}H_{40}$	Нонадекан	+		
$C_{20}H_{42}$	Эйкозан	+	+	+
$C_{21}H_{44}$	Генейкозан	+		+
$C_{24}H_{50}$	Тетрокозан	+		

Неразветвленные, линейные, алканы более характерны для абиотического контроля, питательной среды с нефтью, но в отсутствие накопительной культуры. Отсутствие более легкой фракции алканов (<C11) в биотическом образце — минеральной среде с нефтью и инкубированной с накопительной культурой при 30 °С, может свидетельствовать об их первоочередной утилизации микроорганизмами. Присутствие большинства алканов в пробе среды с сырой нефтью в присутствии накопительной культуры, инкубированной при 15 °С,

может свидетельствовать об усложнении их доступности в качестве субстрата при пониженной — неоптимальной температуре.

Метилированные соединения присутствовали как в биотических, так и в абиотических в пробах. В пробах минеральной среды с нефтью, инкубированной в присутствии накопительной культуры, были отмечены соединения, содержащие в своем составе хлор и йод. Вероятно, их появление связано с метаболизмом углеводород-деградирующих микроорганизмов.

Таблица 2.2

Соединения, идентифицированные в процессе ГХ/МС анализа (алканы, имеющие дополнительные группы)

Молекулярная формула	Название	Абиотический контроль	Биотический образец, 30 °С	Биотический образец, 15 °С
$C_{11}H_{24}$	4-метилдекан	+		
$C_{11}H_{24}$	5-метилдекан	+		
$C_{13}H_{28}$	2,6-диметилундекан	+		
$C_{13}H_{28}$	6-метилдодекан			+
$C_{14}H_{30}$	4,6-диметилдодекан			+
$C_{16}H_{33}Cl$	1-хлорогексадекан		+	
$C_{18}H_{37}I$	1-йодооктадекан		+	+
$C_{19}H_{40}$	2,6,10,14-тетраметилпентадекан	+	+	+
$C_{20}H_{41}Cl$	1-хлорэйкозан			+
$C_{34}H_{70}$	3-метилтриакоктан		+	

Таблица 2.3

Соединения, идентифицированные в процессе ГХ/МС анализа (ароматические соединения)

Молекулярная формула	Название	Абиотический контроль	Биотический образец, 30 °С	Биотический образец, 15 °С
C_7H_8	Толуен	+		
C_8H_{10}	ρ-Ксилен	+		
C_9H_{12}	1,3,5-триметилбензол	+		
C_9H_{12}	1-этил-2-метилбензол	+		
$C_{10}H_{14}$	1-этил-3,5-диметилбензол	+		
$C_{10}H_8$	1-метил-1Н-инден			+
$C_{11}H_{10}$	1-метилнафталин		+	+
$C_{11}H_{10}$	2-метилнафталин		+	+
$C_{12}H_{12}$	11,6- диметилнафталин			+
$C_{12}H_{12}$	2,3-диметилнафталин		+	
$C_{12}H_{12}$	2,6- диметилнафталин		+	+
$C_{13}H_{14}$	1,4,6- триметилнафталин		+	
$C_{13}H_{14}$	1,6,7- триметилнафталин		+	+
$C_{15}H_{12}$	1-метилфенантрин			+

В биотических контролях были обнаружены углеводороды ароматического ряда, состоящие исключительно из двух бензольных колец, в то время как в абиотическом контроле — соединения, состоящие из

одного. Для биотических проб свойственно наличие полиароматических соединений. Это характерно как для проб, инкубированных при 30 °С, так и для проб, инкубированных при 15 °С.

Таблица 2.4

Соединения, идентифицированные в процессе ГХ/МС анализа (сложные соединения)

Молекулярная формула	Название	Абиотический контроль	Биотический образец, 30 °С	Биотический образец, 15 °С
$C_{13}H_{10}F_3N_3O$	N-(2-трифлуорометилфенил)-пиридин-3-карбоксамид		+	+
$C_{14}H_9Cl_5$	Хлорофенотан			+
$C_{19}H_{37}ClO_2$	2- гексадециловый эфир хлорпропионовой кислоты		+	
$C_{21}H_{38}O_3$	Бут-2-ин-1-ил гептадециловый эфир карбоновой кислоты		+	
$C_{25}H_{52}O_3S$	2-этилгексилгептадециловый эфир сернистой кислоты		+	
$C_{30}H_{37}F_3O_2$	Октакосил-трифлюороацетат			+
$C_{32}H_{64}O_2$	Триаконтил-ацетат			+
$C_{35}H_{65}F_5O_2$	Дотриаконтил-пентафлюоропропионат			+
$C_{36}H_{65}F_7O_2$	Дотриаконтил-перфлюоробутират			+
$C_{41}H_{77}F_5O_2$	Октатриаконтил-пентафлюоропропионат		+	

Сложные соединения, такие как эфиры различных кислот, соединения, содержащие многочисленные атомы фтора, хлора, или азота, были характерны исключительно для биотических образцов. Полученные в ГХ/МС анализе минеральных сред биотических и абиотических проб данные позволяют предположить, что метилирование углеводов, а также образование сложных соединений связаны с метаболизмом бактериального сообщества накопительной культуры, принимающего участие в окислении компонентов нефти.

Для подтверждения гипотезы о том, что эти превращения связаны с деятельностью бактерий и не возникают вследствие физических факторов, таких как температура, свет и т.д., необходимо повторное проведение эксперимента с использованием в качестве дополнительного контроля 1% об. нефти в питательной среде в отсутствие бактерий, но инкубированной в тех же условиях, что и биотический образец.

Обсуждение

Из вод Балтийского моря была получена бактериальная культура, включающая в себя не менее 5 видов, способных использовать нефть в качестве источника углеводорода, как следует из данных секвенирования библиотек бактериальных последовательностей. На основании анализа варибельного участка V4 гена, кодирующего последовательность малой (16S) субъединицы бактериальной рРНК, было установлено, что преобладающим родом в сообществе микроорганизмов является *Acinetobacter*. На основании результатов, полученных с помощью секвенирования по Сенгеру, преобладающий микроорганизм отнесли к виду *A. haemolyticus*.

Acinetobacter — это род аэробных грамотрицательных бактерий, принадлежащих к классу гаммапротеобактерий. Он включает в себя не менее 38 видов, которые распространены повсеместно, включая почву и воду [9].

ГХ/МС анализ показал, что профиль метаболитов, появляющихся в среде, в которой присутствуют нефть и бактерии, отличается от профиля метаболитов среды, где имеется только нефть, что может свидетельствовать о том, что отдельные соединения нефти были утилизированы в результате метаболизма микроорганизмов в сообществе.

К сожалению, данных ГХ/МС анализа недостаточно для вывода о том, что превращение одних соединений в другие обусловлено только метаболизмом бактерий, поскольку состав нефти мог измениться под воздействием физических факторов, таких как температура, свет и т.д.

Необходимо повторное проведение эксперимента с использованием в качестве дополнительного контроля 1% об. нефти в минеральной среде в отсутствие бактерий, но инкубированной в тех же условиях, что и биотический контроль.

Гидрофобная природа поверхности бактериальных клеток играет важную роль в контакте с нерастворимыми в воде субстратами, такими как нефть, что является ключевым моментом на начальной стадии деградации алифатических и ароматических углеводородов нефти. Поглощение длинноцепочечных алканов нефти бактериями возможно по двум механизмам. Первый механизм связан с непосредственным контактом бактериальной клетки с субстратом, а второй механизм предполагает взаимодействие секретируемых бактериальных факторов, таких как сурфактанты, с гидрофобными соединениями нефти, после чего происходит поглощение этого комплекса бактериальными клетками [6]. Известно, что различные

виды *Acinetobacter* производят такие биосурфактанты, как сложные поверхностно-активные вещества, например, эмульсан (*A. calcoaceticus* RAG-1) и аласангликопротеины (*A. radioresistens* КА-53) [8], адеполипопротеины [10].

Выделение и исследование этих поверхностно-активных веществ из изолированного нами вида бактерий *A. haemolyticus* являются следующим шагом для выявления факторов, способствующих эффективной деградации нефтяных загрязнений вод Балтийского моря. В дальнейшей работе также будет детально исследоваться возможность удаления отдельных компонентов сырой нефти, как простых алканов, так и ароматических соединений выявленным бактериальным видом, *Acinetobacter haemolyticus*. Изучение потенциала очищения Балтийского моря от нефтяных загрязнений природными микроорганизмами имеет важное значение для экологического контроля данной экосистемы, поскольку позволяет создать методы очистки Балтийского моря, не нарушающие трофические связи экосистемы. Кроме того, своевременный анализ микробного сообщества, включая идентификацию отдельных бактериальных видов и биохимический анализ потребляемых соединений и выделяемых метаболитов, даст возможность сократить время, необходимое для принятия решения о методах очистки окружающей среды.

Заключение

В настоящей работе для идентификации микробных сообществ, обитающих в водах Балтийского моря и способных деградировать сырую нефть, были использованы методы молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, секвенирования нового поколения и биоинформатического анализа больших баз данных. Комбинации методов молекулярной биологии, связанные с метагеномным анализом, основанным на высокопроизводительном секвенировании амплифицированных ДНК, соответствующих гену 16S рРНК, и микробиологических методов позволили определить видовую принадлежность бактерии как *Acinetobacter haemolyticus*, которая показала способность обитать, размножаться и утилизировать нефть в составе питательной среды.

Благодарности

Авторы выражают свою признательность Луневу Евгению Андреевичу за помощь в биоинформатической обработке данных, полученных с помощью платформы MiSeq, и Чупахину Евгению Геннадьевичу за помощь в получении хроматограмм ГХ/МС-анализа.

Работа выполнена при частичном финансировании из средств Российского фонда фундаментальных исследований (договор № 19-316-60002/19 от 22.08.2019), и частичном финансировании из средств субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И. Канта (5-100).

Литература

1. Скорнякова А., Корнейчук Н., Вялкина Н., Дембо Ж., Черный К. Подвижки на шельфе // Сибирская нефть. — 2008. — № 50. — С. 14–18.
2. An D. et al. Metagenomics of hydrocarbon resource environments indicates aerobic taxa and genes to be unexpectedly common // Environ. Sci. Technol. — 2013. — Vol. 47. — No. 18. — P. 10708–10717. Supporting information: https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/es4020184/suppl_file/es4020184_si_001.pdf.
3. Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.C., and Frankenberger W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation // Bioresour. Technol. — 2005. — Vol. 96. — No. 9. — P. 1049–1055.
4. Bourne W.R.P. Oil pollution in the Baltic // Marine Pollution Bulletin. — 1978. — Vol. 9. — No. 1. — P. 5.
5. Camacho C. et al. BLAST® Command Line Applications User Manual [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008—. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279690>.
6. Cameotra S.S., Singh P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species // Microb Cell Fact. — 2009. — Vol. 8. — No. 16. — P. 1–7.
7. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample // PNAS. — 2011. — Vol. 108. — P. 4516–4522.
8. Desai J.D., Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1997. — Vol. 61. — P. 47–64.
9. Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview // Microbes and Environments. — 2011. — Vol. 26. — No. 2. — P. 101–112.
10. Fenibo E.O., Ijoma G.N., Selvarajan R., Chikere C.B. Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation // Microorganisms. — 2019. — Vol. 7. — No. 581. — P. 1–29.
11. Gasol J.M. and Moran X.A.G. Flow cytometric determination of microbial abundances and its use to obtain indices of

- community structure and relative activity / In: *Hydrocarb. Lipid Microbiol. Protoc.* – Springer Protoc. Handbooks. Berlin, Germany: Springer, 2015. – P. 159–187.
12. *Kostianoy A.G., Lavrova O.Yu.* Oil Pollution in the Baltic Sea / In: *The Handbook of Environmental Chemistry.* – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. – 274 p.
 13. *Kube M. et al.* Genome sequence and functional genomic analysis of the oil-degrading bacterium *Oleispira antarctica* // *Nat. Commun.* – 2013. – Vol. 4. – Art. 2156. doi: 10.1038/ncomms3156.
 14. *Oller I., Malato S., and Sánchez-Pérez J.A.* Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination – A review // *Sci. Total Environ.* – 2011. – Vol. 409. – No. 20. – P. 4141–4166.
 15. *Patowary K., Patowary R., Kalita M.C., and Deka S.* Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 279. doi:10.3389/fmicb.2017.00279.
 16. Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol (PCI) DNA Extraction [online]. [Modified from protocols by Barker et al. (1998)] Available at: http://ccoon.myweb.usf.edu/ecoimmunology.org/About_Home.html.
 17. *Ronald A.M.* Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective // *Microbiol. Rev.* – 1981. – Vol. 45. – No. 1. – P. 180–209.
 18. *Schedler M., Hiessl R., Juárez A.G.V., Gust G., Müller R.* Effect of high pressure on hydrocarbon-degrading bacteria // *New Glass.* – 1999. – Vol. 20. – No. 2. – P. 49–54.
 19. *Seyedi S.M., Rajaei S., Raiesi F., Shiran B., Raheb J.* Characterization and potentials of indigenous oil-degrading bacteria inhabiting the rhizosphere of Wild Oat (*Avena fatua* L.) in south west of Iran // *Iranian Journal of Biotechnology.* – 2013. – Vol. 11. – No. 1. – P. 1049–1055.
 20. *Szymczycha B. and J. Pempkowiak J.* The role of submarine groundwater discharge as material source to the Baltic Sea. – Springer International Publishing, 2016. – 136 p.
 21. *Tocchi C., Federici E., Fidati L., Manzi R., Vinciguererra V., and Petruccioli M.* Aerobic treatment of dairy wastewater in an industrial three-reactor plant: Effect of aeration regime on performances and on protozoan and bacterial communities // *Water Res.* – 2012. – Vol. 46. – No. 10. – P. 3334–3344.
 22. *Varjani S.J.* Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresour. Technol.* – 2013. – Vol. 223. – P. 277–286.

IDENTIFICATION OF THE PREDOMINANT BACTERIAL SPECIES IN THE OIL-DEGRADING COMMUNITY OF MICROORGANISMS OF THE BALTIC SEA, FOR THE 16S rRNA GENE

I.V. PTASHNIK, D.V. MIKHNO, M.I. ZIMINA, S.A. SUKHIKH, O.O. BABICH, L.V. MATSKOVA

Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

With the increase in oil production, the need for finding effective ways to protect the environment from negative anthropogenic influence is growing. Microorganisms are capable of utilizing oil hydrocarbons in their metabolism. This function can be used to reduce the consequences of accidents associated with the production, transportation or processing of petroleum products, so it is urgent to identify and study natural microorganisms that can utilize oil components. During this study, a growing culture of microorganisms capable of using oil components as the sole carbon source was selected, isolated and identified from the Baltic Sea. The predominant species in the culture was identified as *Acinetobacter haemolyticus*. A chromatographic analysis of the culture medium was carried out after incubation in the presence or absence of oil and a growing culture of microorganisms. This made it possible to conclude that the microorganisms were capable of metabolizing oil hydrocarbons. In samples with an oil-degrading bacterial culture enriched with *Acinetobacter haemolyticus*, twice as many methylated compounds were found as in the control samples. Additionally, compounds containing iodine, chlorine and sulfur elements were found.

Keywords: oil degradation, *Acinetobacter*, next generation sequencing.

ХАРАКТЕРИСТИКА И ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ПОЛИ- И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЬЮГАТОВ К ХОЛЕРНОМУ ТОКСИНУ

О.А. ЯКУШЕВА*, Л.П. АЛЕКСЕЕВА, В.П. ЗЮЗИНА,
И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ, М.Э. ЯГОВКИН

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Разработана схема, на основании которой были приготовлены моно- и поликлональные конъюгаты с титром 1:32–1:64 и соответственно 1:64–1:128; их чувствительность в ИФА и дот-ИФА составила 10 нг/мл. В результате электрофореза в ПААГ супернатантов токсигенного и нетоксигенного штаммов *V. cholerae* El Tor и последующего их анализа в иммуноблоте с помощью полученных конъюгатов выявлены профили, соответствующие субъединице В холерного токсина и свидетельствующие об их специфичности.

Ключевые слова: холерный токсин, пероксидазные конъюгаты, поликлональный тип, моноклональный тип, диагностическое значение.

Введение

В настоящее время методы детекции холерного токсина (ХТ) развиваются в двух направлениях: первое заключается в создании сложных автоматизированных систем; второе — в разработке методов, исключающих необходимость в дорогом стационарном оборудовании. Следует отметить, что за рубежом используют как сложные системы, такие как биочипы и биосенсоры, так и простые: ИФА-системы и иммунохроматографические полоски. Например, для одновременной детекции пяти бактериальных токсинов: холерного токсина, термолабильного токсина кишечной палочки и трех токсинов *Staphylococcus aureus* (энтеротоксинов А и В и токсина синдрома токсического шока) был разработан микрочип [13], который способен за 10 минут обнаружить их в пробах воды из природных источников с чувствительностью 0,1–1 пг/мл и в пробах пищи (молока и мясных экстрактов чувствительностью до 1 пг/мл). В нашей стране для детекции биологических токсинов (ХТ, летального фактора сибиреязвенного токсина, протективного антигена сибиреязвенного токсина, дифтерийного токсина, рицина

и стафилококковых энтеротоксинов А (SEA), В (SEB), I (SEI), G (SEG)) разработан, но не зарегистрирован гидрогелевый иммуночип, способный выявлять ХТ в дозе 0,44 нг/мл в пробах воды из открытых водоемов, молоке, а также в мясных бульонах [3].

Для детекции и количественного определения холерного токсина зарубежные исследователи используют электрохимические биосенсоры на основе антител, преимущественно моноклональных, с чувствительностью 1 нг/мл [14], а также биосенсоры, содержащие синтетические пептиды как более чувствительные и недорогие в получении альтернативы. Короткие пептиды, как и антитела, связываются с субъединицей В ХТ, и полученный комплекс определяется с помощью поверхностного комбинационного рассеивания (SERS), предел обнаружения токсина — 3,51 пг/мл [10]. В нашей стране биосенсоров для детекции холерного токсина нет.

В зарубежных публикациях отмечается, что ИФА-системы остаются наиболее используемыми, достоверными и рекомендованными рядом контролирующих организаций такими, например, как, Американская администрация по анализу пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA), Европейское агентство по контролю качества пищевых продуктов [3]. При этом лабораториями ВОЗ и CDC также предложено использовать GM1-ИФА для выявления и количественного определения ХТ. Наряду с этим методом для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* используют «сэндвич» вариант дот-ИФА,

© 2020 г. Якушева О.А., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Архангельская И.В., Яговкин М.Э.

* Автор для переписки:

Ольга Александровна Якушева
научный сотрудник лаборатории гибридом, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
E-mail: yakusheva_oa@antiplague.ru

обеспечивающий обнаружение холерного токсина в культуральных жидкостях в дозе 1 нг/мл [11], или специфичный, двойной «сэндвич»-ИФА на основе IgY птиц с чувствительностью метода 33 пг/мл [6], и иммунохроматографические тест-системы с чувствительностью 10 фг/мл [5].

В нашей стране разработаны и зарегистрированы две тест-системы для детекции холерного токсина «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae*» и «ИХ-диагностические тест-полоски *Vibrio cholerae* tox+». Однако они пока не получили широкого применения в отечественной лабораторной практике, поэтому актуальной задачей в лабораторной диагностике холеры по-прежнему остается проблема конструирования новых широко доступных диагностических средств детекции холерного токсина. Возможным ее решением может быть создание иммунодиагностических тест-систем на основе прямых пероксидазных конъюгатов [1].

Пероксидазные конъюгаты для постановки прямого варианта ИФА могут служить универсальными реагентами для различных по чувствительности реакций, таких как «прямой» вариант ИФА, метод двойных антител, GM-ИФА, а также различные варианты дот-ИФА.

Такие диагностические препараты, особенно на основе моноклональных антител (МКА) с установленной эпитопной направленностью, эффективны и в плане решения определенных научных задач, касающихся изучения продукции токсина у измененных штаммов *V. cholerae*.

Цель работы — получить, охарактеризовать и оценить диагностическую значимость поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов к холерному токсину.

Материалы и методы

В качестве антигена был использован препарат холерного токсина, полученный из штамма *V. cholerae* O1 569B [1]. Источником иммуноглобулинов служили поликлональные сыворотки [4] и моноклональные антитела, любезно предоставленные ст.н.с. С.Ф. Бекетовым (ГНИЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск). Также использовали МКА (5A7; 2F8), полученные в рамках выполнения предыдущих научных тем.

Конъюгацию очищенных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (ПХ) (RZ>3, активность >250 ед/мг) проводили по методу Nakane P.K. [12]. Очистку конъюгатов осуществляли методом гель-фильтрации

на сефадексе G-100 или путем диализа против 0,01 М фосфатного буфера. Очищенные конъюгаты собирали фракциями от 4 до 5 мл и определяли оптическую плотность (ОП) каждой фракции при длинах волн 430 и 280. Коэффициент связывания (К) конъюгата рассчитывали по следующей формуле:

$$K = \frac{D_{430}}{D_{280}}$$

Фракции, вышедшие первым основным пиком и имеющие К=0,6 и выше, объединяли и хранили при минус 20 °С.

Чистоту препаратов моно- и поликлональных конъюгатов определяли с помощью иммуноблота, используя в качестве источника токсина супернатанты токсигенного и нетоксигенного штаммов *V. cholerae*. Электрофорез супернатантов проводили по U.K. Laemmli [9] в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в системе Bio-Rad (США). Использовали маркеры молекулярной массы фирмы Bio-Rad.

Активность полученных конъюгатов оценивали в ИФА и дот-ИФА по специфичности, чувствительности и определению рабочего разведения путем шахматного титрования. Разведения токсинсодержащих препаратов и конъюгатов готовили в натрий-фосфатном буфере (НФБ), содержащем 0,05% твина-20 и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), рН 7,4. Результаты вычисляли после шахматного титрования по разнице экстинкций между опытом и контролем. Внутренним контролем для каждого разведения конъюгата служило отсутствие определяемого ХТ в системе. Чувствительность конъюгатов оценивали как минимально выявляемую концентрацию ХТ. Рабочее разведение конъюгатов устанавливали как максимальное их разведение, обеспечивающее сохранение чувствительности системы. Специфичность экспериментальных серий полученных антительных пероксидазных конъюгатов определяли по степени перекрестной реактивности с набором супернатантов штаммов рода *Vibrio* и семейства *Enterobacteriaceae*: 7 — *V. cholerae* O1 Classical ctx+; 20 — *V. cholerae* O1 El Tor ctx+; 25 — *V. cholerae* O1 El Tor ctx-; 5 — *V. cholerae* O139 ctx+; 4 — *V. cholerae* O139 ctx-; 2 — *V. cholerae* non-O1/ non-139; 2 — *Escherichia coli*; 2 — *Aeromonas hydrophila*; 1 — *Salmonella typhimurium*. Супернатанты получали после выращивания испытуемых штаммов в среде АК1 по стандартному методу M. Iwanaga [8]. Бактериальную

массу обеззараживали мертиолятом натрия (1:10000), выдерживали сутки в холодильнике, после чего делали трехкратные высевы на специфическую стерильность. Обеззараженную бактериальную массу осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000 об./мин. Супернатанты штаммов разводили в карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,5) и использовали в дальнейших исследованиях. В качестве положительного контроля использовали препарат очищенного ХТ [1], отрицательным контролем была среда АК1.

Постановку прямого ИФА в полистироловых планшетах осуществляли по общепринятой методике [2]. Супернатанты штаммов вносили в лунки планшета и инкубировали в течение двух часов при 37 °С, отмывали трижды НФБ. Блокирование несвязавшихся сайтов полистироловых лунок с токсинсодержащими препаратами проводили 1% бычьим сывороточным альбумином в течение 20 мин, затем трижды отмывали НФБ. В отмывые лунки вносили исследуемые конъюгаты в определенном разведении. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 60 мин, отмывали и вносили раствор субстратной смеси 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Bio Tek EL*800 (Bio Tek Instruments, U.S.A.) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм).

Для постановки дот-ИФА по методике Veutip L. [7] с нашими модификациями использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мм (Bio-Rad). Все манипуляции проводили с помощью анатомического пинцета, не касаясь мембраны руками. Сенсibilизацию мембраны объемом 5 мкл/точку осуществляли при комнатной температуре, блокирование несвязавшихся сайтов мембраны с антигеном проводили 1% БСА в НФБ, в течение 20 мин. Отмывку мембран осуществляли в НФБ рН 7,2–7,4. На заключительном этапе мембрану погружали в раствор субстратной смеси, содержащей диаминобензидин (Aldrich). После проявления пятен реакцию останавливали промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Результаты и обсуждение

Чувствительность, специфичность и воспроизводимость ИФА зависит, как правило, от качества используемых конъюгатов. Принято считать, что наиболее эффективным методом конъюгации является периодатный и соответственно это определило наш выбор. Первоначально были отработаны и оптимизированы

условия конъюгации поли- и моноклональных антител с пероксидазой хрена, на основании которых выделено несколько этапов, заключающихся в активации ПХ, иммобилизации ее с иммуноглобулинами (Ig), очистки от несвязавшихся компонентов, контроле активности, хранении. Согласно методике Nakane P.K. et al. [12], пероксидазу конъюгируют с антителами в соотношении 1:1 по белку. Экспериментально нами было установлено, что наиболее оптимальным является соотношение ПХ и Ig 1:2. Очистку конъюгатов проводили методом гель-фильтрации на сефадексе G-100. При прохождении через колонку конъюгаты выходили первым основным пиком с коэффициентом связывания $K \geq 0,6$.

Максимальное разведение экспериментальных серий поли- и моноклональных конъюгатов, при котором регистрируется положительная реакция, определяли методом шахматного титрования в прямом ИФА и дот-ИФА, используя в качестве контроля препарат очищенного токсина и супернатант нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1.

В результате титрования установили, что иммунопероксидазные конъюгаты, полученные на основе МКА, при взаимодействии с очищенным токсином имели предельный титр 1:256 в ИФА и дот-ИФА, а поликлональные соответственно 1:512. В то же время титры моно- и поликлональных конъюгатов в аналогичных реакциях с супернатантом токсигенного штамма *V. cholerae* равнялись 1:32–1:64 и соответственно 1:64–1:128, то есть были ниже. Оценка чувствительности моно- и поликлональных конъюгатов показала, что она составляет 10 нг/мл, тогда как холерные вибрионы O1 и O139 обычно продуцируют в среду культивирования от 4 до 16 нг/мл токсина. В последующих экспериментах конъюгаты использовали в рабочем разведении 1:32 и 1:64, поскольку в этих титрах они обеспечивали четкую положительную реакцию.

Качество полученных поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов оценивали в иммуноблоттинге как результат их взаимодействия с супернатантами токсигенного и нетоксигенного штаммов *V. cholerae* O1. Последние были разделены в SDS-ПААГ и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану, после чего она была обработана поли- и моноклональными пероксидазными конъюгатами. Как видно на рисунке 1, в бесклеточном супернатанте токсигенного штамма *V. cholerae* O1 оба варианта конъюгатов выявляли только одну полосу в районе 11–13 кДа, соответствующую локализации В-субъединицы и свидетельствующую о чистоте препаратов.

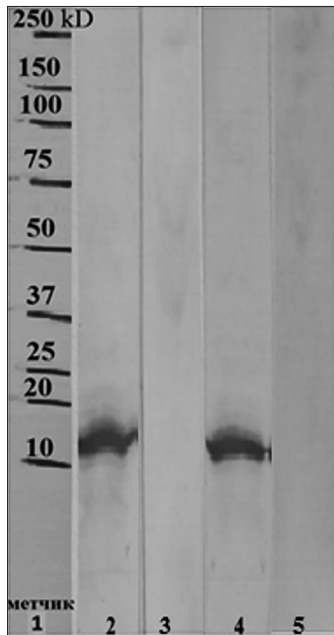


Рис. 1. Иммуноблоттинг препаратов моно- и поликлональных пероксидазных конъюгатов с супернатантами токсигенного и нетоксигенного штаммов *V. cholerae* O1: 1 – маркеры мол. масс; 2 – супернатант штамма *V. cholerae* O1 569 В ctx^{++} поликлональный пероксидазный конъюгат; 3 – супернатант штамма *V. cholerae* O1 18367 ctx^{-} + поликлональный пероксидазный конъюгат; 4 – супернатант штамма *V. cholerae* O1 569 В ctx^{+} + моноклональный пероксидазный конъюгат; 5 – супернатант штамма *V. cholerae* O1 18367 ctx^{-} + моноклональный пероксидазный конъюгат

По отработанной схеме мы приготовили 3 серии экспериментальных образцов моноклональных и поликлональных пероксидазных конъюгатов и оценили их диагностическую значимость на 68 супернатантах музейных штаммов с помощью ИФА и дот-ИФА. В

результате было установлено, что при взаимодействии поликлонального пероксидазного конъюгата с супернатантами *V. cholerae* Classical в ИФА положительная реакция зарегистрирована у 6 из 7 исследуемых токсигенных штаммов; в то же время с помощью моноклонального конъюгата ХТ был выявлен только у 5 штаммов. Определение в ИФА ХТ у токсигенных штаммов *V. cholerae* El Tor показало, что из 20 взятых в опыт супернатантов с поликлональным конъюгатом взаимодействовало 17, а с моноклональным – 15; при этом ложноотрицательные результаты в первом и втором случаях не совпадали. В случае взаимодействия супернатантов токсигенных *V. cholerae* O139 с моно- и поликлональными конъюгатами положительную реакцию регистрировали в 3 из 5. Анализ супернатантов нетоксигенных *V. cholerae* El Tor позволил констатировать отрицательную реакцию с моноклональным конъюгатом, что свидетельствует о его специфичности. В то же время поликлональный взаимодействовал с 2 из 25 испытываемых нетоксигенных супернатантов *V. cholerae* El Tor, по-видимому, с ним возможны единичные ложноположительные реакции. Перекрестные реакции обоих конъюгатов с супернатантами токсигенных штаммов *E. coli*, имеющими токсин на 80% структурно сходный с ХТ, и клинических штаммов *V. cholerae* non-O1, non-O139 отсутствовали. С учетом полученных показателей чувствительность в ИФА моно- и поликлонального конъюгатов составила 71,8 и 84,3% соответственно.

Специфическая активность иммунопероксидазных конъюгатов в отношении токсинсодержащих образцов холерных вибрионов O1, O139 была исследована в прямом варианте дот-ИФА и результаты их взаимодействия представлены на рисунке 2.

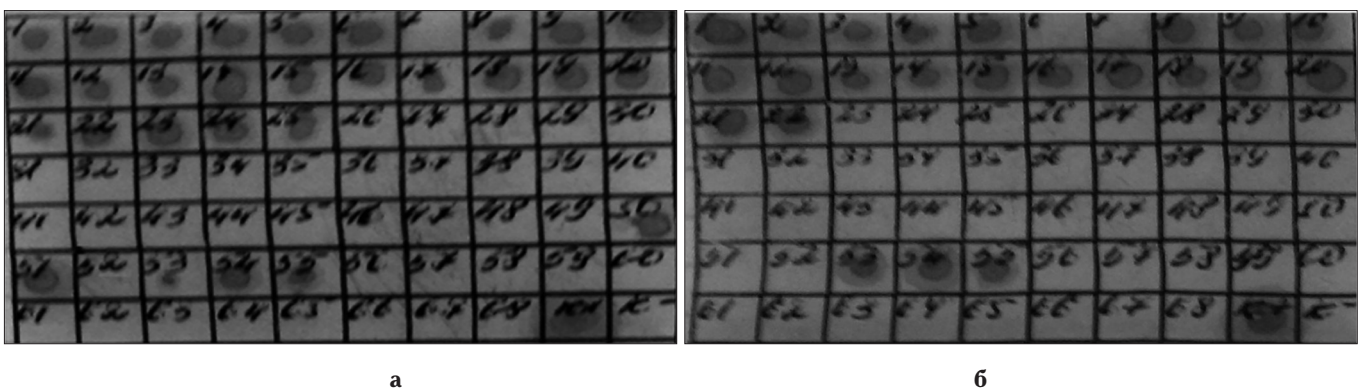


Рис. 2. Результаты тестирования в реакции дот-ИФА поли- и моноклонального пероксидазного конъюгата: а – поликлональный пероксидазный конъюгат; б – моноклональный пероксидазный конъюгат; 1–7 – *V. cholerae* O1 Classical ctx^{+} ; 8–27 – *V. cholerae* O1 El Tor ctx^{+} ; 28–52 – *V. cholerae* O1 El Tor ctx^{-} ; 53–57 – *V. cholerae* O139 ctx^{+} ; 58–61 – *V. cholerae* O139 ctx^{-} ; 62–63 – *V. cholerae* non-O1/non-139, 64–65 – *E. coli*; 66–67 – *A. hydrophila*; 68 – *S. typhimurium*

Отсутствие окрашенных пятен на НЦМ у нетоксигенных супернатантов *V. cholerae* O1, O139 — показатель отрицательной реакции дот-ИФА и свидетельство строгой специфичности моноклонального конъюгата. Аналогичный результат установлен и в отношении гетерологичных штаммов, в том числе и токсигенных *E. coli*, что подтверждает его специфичность. При использовании поликлонального конъюгата регистрировали ложноположительную реакцию в отношении 2 супернатантов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, как и в случае планшетного ИФА.

Анализ токсинсодержащих супернатантов продемонстрировал отсутствие коричневых пятен с моноклональным пероксидазным конъюгатом у 6 штаммов холерных вибрионов O1 и у 3 — в реакции с поликлональным. Причем, последний не обнаруживал ХТ у одних штаммов, моноклональный — у других. Сопоставление результатов, полученных при использовании моно- и поликлональных конъюгатов, показало, что с их помощью регистрируется наличие ХТ у разных штаммов. Это несовпадение является положительным моментом, так как применение 2 типов конъюгатов расширяет наши возможности в плане детекции токсинпродуцирующих штаммов и способствует повышению достоверности лабораторного анализа.

Заключение

Нами была разработана схема, на основании которой были приготовлены моно- и поликлональные конъюгаты с титром 1:32–1:64 и соответственно 1:64–1:128, их чувствительность в ИФА и дот-ИФА составила 10 нг/мл. В результате электрофореза в ПААГ супернатантов токсигенного и нетоксигенного штаммов *V. cholerae* El Tor и последующего их анализа в иммуноблоте с помощью полученных конъюгатов выявлены профили, соответствующие субъединице В холерного токсина и свидетельствующие об их специфичности. Применение поли- и моноклональных конъюгатов в прямых вариантах иммуноферментного анализа, наряду с другими методами, будет способствовать повышению качества и достоверности лабораторных исследований на холеру.

Литература

1. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Зюзина В.П., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В. Современные методические приемы очистки холерного токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 5–9.

2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с.
3. Петрова Е.Э., Комалева Р.Л., Лахтина О.Е., Самохвалова Л.В., Калинина Н.А., Шошина Н.С., Рубина А.Ю., Филиппова М.А., Вертиев Ю.В., Валякина Т.И., Гришин Е.В. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину // Биоорганическая химия. — 2009. — Т. 35. — № 3. — С. 357–367.
4. Якушева О.А., Алексеева Л.П., Писанов Р.В., Зюзина В.П., Яговкин М.Э., Дуванова О.В., Шипко Е.С. Получение антитоксических сывороток и возможность их применения в диагностике холеры // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». — 2019. — Вып. 4. — С. 426–433.
5. Ahn-Yoon S., DeCory T.R., Baemner A.J., Durst R.A. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin // Anal. Chem. — 2003. — Vol. 75. — No.10. — P. 2256–2261.
6. Bayat M., Khabiri A., Hemati B. Corrigendum to «Development of IgY-Based Sandwich ELISA as a Robust Tool for Rapid Detection and Discrimination of Toxigenic *Vibrio cholerae*» // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. — 2019. doi: 10.1155/2019/4164982.
7. Beutin L., Bode L., Richter T., Peltre G., R. Stephan R. Rapid visual detection of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* Heat-labile enterotoxins by nitrocellulose enzyme-linked immunosorbent assay // J. Clin. Microbiol. — 1984. — Vol. 19. — No. 3. — P. 371–375.
8. Iwanaga M., Kuuyakanond T. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water // J. Clin. Microbiol. — 1987. — Vol. 25. — No. 1. — P. 2314–2316.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. — Vol. 227. — No. 5259. — P. 680–685.
10. Lim J.M., Heo N.S., Oh S.Y., Ryu M.Y., Seo J.H., Park T.J., Huh Y.S., Park J.P. Selection of affinity peptides for interference-free detection of cholera toxin // Biosens. Bioelectron. — 2018. — Vol. 99. — P. 289–295.
11. Meza-Lucas A., Pérez-Villagómez M.F., Martínez-López J.P., García-Rodea R., Martínez-Castelán M.G., Escobar-Gutiérrez A., de-la-Rosa-Arana J.L., Villanueva-Zamudio A. Comparison of DOT-ELISA and standard-ELISA for detection of the *Vibrio cholerae* toxin in culture supernatants of bacteria isolated from human and environmental samples // Indian J. Microbiol. — 2016. — Vol. 56. — No. 3. — P. 379–382.
12. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — Vol. 22. — P. 1084–1091.
13. Shlyapnikov Y.M., Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. Rapid simultaneous ultrasensitive

immunodetection of five bacterial toxins // *Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 84. – No. 13. – P. 5596–5603. doi: 10.1021/ac300567f. Epub 2012 Jun 18.

14. Valera A.E., Nesbitt N.T., Archibald M.M., Naughton M.J., Chiles T.C. On-chip electrochemical detection of cholera using a polypyrrole-functionalized dendritic gold sensor // *ACS Sens.* – 2019. – Vol. 4. – No. 3. – P. 654–659.

Список сокращений

ХТ – холерный токсин;

ИФА – иммуноферментный анализ;

FDA – (англ. Food and Drug Administration)

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

CDC – (англ. Centers for Disease Control) Центры по контролю и профилактике заболеваний США;

IgY – иммуноглобулины птицы;

GM1-ИФА – иммуноферментный анализ, при котором антиген улавливается ганглиозидами;

дот-ИФА – иммуноферментный анализ, осуществляющийся на разных полимерных мембранах;

двойной «сэндвич»-ИФА – иммуноферментный анализ, при котором антиген «зажат» между антителами;

МКА – моноклональные антитела;

ПХ – пероксидаза хрена;

ОП – оптическая плотность;

К – коэффициент связывания конъюгата;

НФБ – натрий-фосфатный буфер;

НЦМ – нитроцеллюлозная мембрана;

Ig – иммуноглобулины.

CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF POLY- AND MONOCLONAL PEROXIDASE CONJUGATES TO CHOLERA TOXIN

O.A. YAKUSHEVA, L.P. ALEKSEEVA, V.P. ZYUZINA,
I.V. ARKHANGELSKAYA, M.E. YAGOVKIN

Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

Methods for obtaining polyclonal and monoclonal peroxidase conjugates intended for the detection of cholera toxin in *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in direct variants of ELISA and dot-ELISA have been developed. Experimental tests of conjugates on a set of strains of toxigenic and non-toxigenic cholera vibrios, as well as heterologous microorganisms allowed us to evaluate their specificity and sensitivity equal to 10 ng/ml. It was found that the conjugate based on monoclonal antibody has a high specificity, while in the case of polyclonal, single false-positive reactions can be registered. Along with existing methods, the use of direct variants of ELISA allows to expand their range and contributes to improving the accuracy and reliability of detection of toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1, O139 serogroups.

Keywords: cholera toxin, polyclonal and monoclonal peroxidase conjugate, enzyme immunoassay, dot-ELISA.

РАЗРАБОТКА ИНСТРУКЦИЙ ВНЕСЕНИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ПРОМОТОР ГЕНА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* AOX1A

И.О. ВЕЛЕГЖАНИНОВ, Е.С. БЕЛЫХ, Е.В. ГАРМАШ*

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар

На основе современных технологий геномного редактирования предложены варианты модификаций промотора гена митохондриальной альтернативной оксидазы арабидопсиса *AtAOX1a* для изучения роли фоточувствительных цис-регуляторных элементов промотора гена в регуляции его экспрессии. Проработаны две стратегии внесения точечных мутаций в близко расположенные элементы CACGTG (G-Box и I1 элемент) (96–93 п.о. выше старта транскрипции) и ACGTG (I2 элемент) (73–69 п.о. выше старта транскрипции). Первый вариант связан с использованием CRISPR/Cas системы редактирования оснований в растении дикого экотипа (Col-0). Вторая стратегия — это внесение изменений в последовательности промотора *AtAOX1a*, скопированного из генома растений дикого типа (Col-0), и трансформации таким геном мутантов с нокаутом данного гена (SALK_084897). Обсуждены возможные риски и преимущества обеих стратегий точечных мутаций.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, альтернативная оксидаза, *AtAOX1a*, промотор, точечные мутации, цис-регуляторные элементы, CRISPR/xCas.

Введение

Во внутренней мембране растительных митохондрий наряду с основным (цитохромным) путем транспорта электронов присутствует альтернативный (цианидустойчивый) путь (АП) через альтернативную оксидазу (АОХ), передающую электроны с пула убихинона на кислород (Vanlerberghe, McIntosh, 1997) [21]. Перенос электронов на кислород с участием АОХ, минуя два участка генерации мембранного потенциала (комплексы III и IV), снижает энергетическую эффективность дыхания, как минимум, на 60%. Вовлечение АП способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса в митохондриальной электронтранспортной цепи (ЭТЦ) за счет более быстрого окисления НАДН и препятствует генерации избыточного количества АФК, особенно в условиях стресса (Maxwell et al., 1999) [12]. АОХ назван «белком выживания» растений (Vanlerberghe et al., 2009) [22] и предложен в качестве маркера клеточного перепрограммирования при стрессе (Arnholdt-Schmitt et al., 2006) [1]. Более того, АОХ участвует в окислении избытка восстановителей, экс-

портируемых из хлоропластов в митохондрии, «разгружая» фотосинтетическую ЭТЦ и предотвращая фотоокисление клетки (Noguchi, Yoshida, 2008 [15]; Dinakar et al., 2010 [4]; Garmash et al., 2015, 2017 [6, 7]).

У двудольных АОХ кодируется двумя подсемействами ядерных генов — АОХ1 и АОХ2, у однодольных — одним подсемейством АОХ1 (Polidoros et al., 2009) [16]. Характер экспрессии генов АОХ зависит от вида, ткани, условий роста и развития растений и связан с полиморфизмом генов и структурой промотора.

Геном *Arabidopsis thaliana* стал первым секвенированным геномом растения ('The Arabidopsis Genome Initiative', 2000) [19]. Геном *A. thaliana* содержит 4 гена АОХ1(a-d) и один АОХ2 (Clifton et al., 2005) [3]. Ген АОХ1a арабидопсиса (*AtAOX1a*) является моделью в изучении транскрипционного контроля экспрессии АОХ при стрессе (Dojcinovic et al., 2005 [5]; Ho et al., 2008 [10]). Многие аспекты сигналинга АОХ являются предметом исследований и дискуссий (Ho et al., 2008 [10]; Van Aken et al., 2009 [20]; Selinski et al., 2018 [17]). В настоящее время известны АФК-зависимый и АФК-независимый сигнальные пути индукции экспрессии АОХ (Ho et al., 2008 [10]; Selinski et al., 2018 [17]). Кроме того, есть все основания полагать, что экспрессия генов АОХ может напрямую индуцироваться светом. Показано, что в прямой световой индукции *AOX1a* арабидопсиса участвуют фитохромы А, В, криптохромы 1, 2 и фототропины 1, 2 (Terperman et al., 2004 [18];

© 2020 г. Велегжанинов И.О., Белых Е.С., Гармаш Е.В.

* **Автор для переписки:**

Гармаш Елена Владимировна

к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений Института биологии Коми научного центра УрО РАН

E-mail: garmash@ib.komisc.ru

Zhang et al., 2010 [24]). Фототрансдукция сигнала от фоторецепторов до уровня транскрипции светоактивируемых генов опосредована действием определенных транскрипционных факторов (ТФ). В арабидопсисе насчитывается примерно 40 ТФ, участвующих в передаче светового сигнала (Wang et al., 2017) [23]. В промоторе гена *AOX1a* было обнаружено 27 последовательностей, которые могут быть регуляторными элементами (*cis-regulatory elements*, CAREs) светоиндуцируемых ТФ, из которых 9 — с высокой вероятностью. Кроме того, с помощью конструкции, состоящей из маркерного гена *beta-D-glucuronidase* (GUS), расположенного после промотора *AOX1a*, было показано, что укорочение промотора с 5'-конца приводит к пропорциональному снижению фотоиндуцируемой активности GUS (Zhang et al., 2010) [24]. Однако это не позволяет говорить о роли отдельных CAREs в фоторегуляции активности *AOX1a*. Среди обозначенных выше CAREs в промоторе гена *AOX1a* арабидопсиса также найден часто встречающийся мотив G-box (CACGTG) (Clifton et al., 2005) [3] и CARE I1 (ACGTG, 93 п.н. от СТ), перекрывающийся с G-box (Ho et al., 2008) [10]. G-box — это палиндромный консервативный CARE промоторов большинства фоторегулируемых генов служит местом связывания транскрипционных факторов GBFs (G-box-binding factors) семейства bZIP (Menkens et al., 1995 [13]; Wang et al., 2017 [23]). Фотоиндуцируемый транспорт GBFs (в частности, GBF-1) из цитоплазмы в ядро является важным этапом трансдукции сигнала между фоторецепцией и светозависимой экспрессией генов (Harter et al., 1994). G-box также найден в промоторе *AOX1a Triticum urartu* (221 и 340 п.н. от СТ), диплоидного прародителя гексоаллоплоида *Triticum aestivum* (Garmash et al., 2017) [7]. В связи с этим фрагмент промотора, содержащий плотно расположенные G-box, I1 и I2 элементы, представляется нам первым кандидатом для изучения влияния точечного мутагенеза на фоторегуляцию активности гена *AOX1a in vivo*. В свою очередь, вопрос о роли ключевых CAREs позволит выявить транскрипционные механизмы индукции гена, детально проанализировать конечные этапы светового сигналинга *AtAOX1a*, что, в целом, даст более глубокое представление о роли митохондриального дыхания в фотосинтезирующей клетке.

Целью данной работы являлась разработка схем осуществления прецизионного редактирования G-box, I1 и I2 регуляторных элементов промотора *AtAOX1a* для изучения их роли в световой и стресс-регуляции экспрессии данного гена в системе *in vivo*.

Материалы и методы

Дизайн конструкций, *in silico* ПЦР и клонирования выполнены с помощью программы SnapGene 5.1.3.1 («GSL Biotech LLC», США). Последовательность гена *AtAOX1a* и промотора скопирована из базы данных Gene NCBI (NC_003074.8).

Результаты и обсуждение

Проработаны варианты модификации (внесения точечных мутаций) в близко расположенные элементы CACGTG (G-Box и I1 элемент) (96–93 п.о. выше старта транскрипции) и ACGTG (I2 элемент) (73–69 п.о. выше старта транскрипции).

Для внесения точечных мутаций выбрано две стратегии. Первая заключается в попытке точечной модификации промотора *AOX1a* в геноме растения дикого типа (Col-0) с помощью недавно разработанной CRISPR/xCas системы редактирования оснований. Вторая стратегия — это внесение изменений в последовательности промотора, скопированного вместе с самим геном *AOX1a* из генома растений дикого типа (Col-0), и трансформация полученной конструкцией мутантов с нокаутом данного гена (SALK_084897).

Для модификации промотора нативного *AOX1a* в растениях дикого типа Col-0 выбрана система редактирования оснований γ YPQ256 на основе Cas9 никазы с модифицированным C-концевым доменом, распознающим PAM последовательность вида NG, вместо канонического NGG (Zhong et al., 2019) [25]. К мутантному Cas9-NG белку присоединена цитидиндезаминаза PmCDA1, которая способна модифицировать цитозин в дезоксиуридин, являющийся субстратом для нескольких механизмов репарации. В большинстве случаев репарация приводит к возвращению цитозина в поврежденный сайт, однако никазная активность Cas9-NG белка ведет к формированию разрыва сахарофосфатного остова противоположной цепи. Это, в свою очередь, определяет преимущественную активность эксцизионной репарации оснований, использующей дезоксиуридин в качестве матрицы при синтезе заплатки. В процессе происходит замена пары C-G на U-A, которая в результате репликации или мисматч-репарации превращается в T-A. Для увеличения приоритета эксцизионной репарации на противоположной цепи, а также для снижения вероятности мутации со сдвигом рамки считывания к конструкции добавлен ингибитор белка репарации урацил-ДНК-гликозилазы (Nishida

et al., 2016 [14]; Hess et al., 2017 [9]). Конструкция доступна в плазмиде рYPQ256 (Addgene #124312). Для осуществления модификации необходимо выполнить транзientную котрансфекцию протопластов растений плазмидой рYPQ256, кодирующей комплекс Cas9-NG-PmCDA1-UGI, и плазмидой рFH6_new (Addgene #105866; Hahn et al., 2017 [8]), в которую предварительно вставить последовательность, кодирующую гидовую РНК с помощью эндонуклеазы BbsI. На наш взгляд, для трансфекции наиболее оптимален протокол, представленный Cao et al. (2016) [2].

Белок Cas9-NG выбран для осуществления данной модификации, так как другие существующие комплексы для CRISPR/Cas опосредованной модификации оснований требуют таких PAM последовательностей, которых нет в непосредственной близости от I1-G-box и I2 элементов промотора *AtAOX1a*. Однако, несмотря на сокращенную PAM последовательность белка Cas9-NG, дизайн гидовых РНК является сложной задачей вследствие низкой эффективности редактирования кон-

струкции рYPQ256 (Zhong et al., 2019) [25]. Нами показано, что в диапазоне от 8 до 20 пар нуклеотидов от цитозинов I1 и I2 элементов (область действия дезаминазы относительно PAM) в промоторе гена *AOX1a* обнаруживаются только потенциальные PAM последовательности с низкой эффективностью редактирования. Наилучший вариант гидовых РНК и их расположения в геноме арабидопсиса представлен на рисунке 1.

Таким образом, редактирование собственного промотора гена *AtAOX1a* потребует трудоемкого отбора клонов, полученных из трансфицированного протопласта. Следует также учитывать, что вероятность гомозиготной модификации после одного раунда модификации низкая, и описанные процедуры модификации будут воспроизведены повторно на гетерозиготных растениях, полученных после первой попытки модификации. Наиболее надежным способом отбора клонов мы считаем секвенирование короткого фрагмента генома, который можно ограничить праймерами – 5'-ATCTAGCTCTTGGCGACCAC-3' и 5'-GCTCCACCGCGAGTTATCAT-3'.

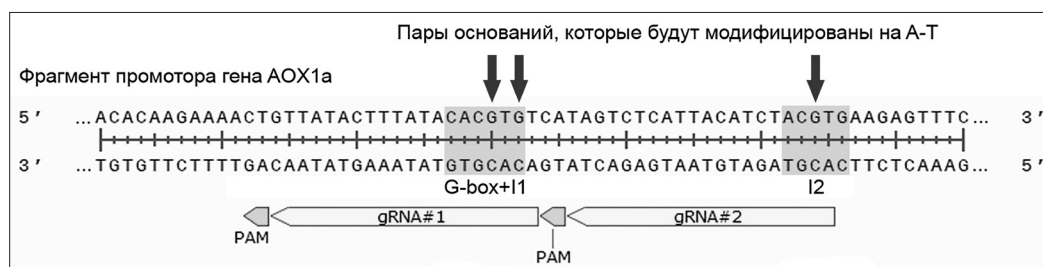


Рис. 1. Фрагмент промотора гена *AOX1a* вблизи СТ. Розовым цветом выделены регуляторные элементы последовательности, подлежащие модификации. Под последовательностью — схема присоединения гидовых РНК в составе комплекса Cas9-NG(D10A)-PmCDA-UGI + sgRNA

Несмотря на описанные сложности, подход с использованием современных инструментов редактирования оснований на базе мутантных версий Cas9 имеет значительные преимущества. Во-первых, модификация происходит в собственном гене растения, а не в трансгене. Это позволяет изучить изменения, которые вызывает мутация на фоне естественного хромосомного контекста. Второе преимущество данного подхода — возможность относительно быстрого создания библиотеки мутантов, несущих единичные точечные изменения в разных регуляторных элементах. Для этого достаточно лишь осуществить котрансфекцию культуры растительных клеток библиотекой плазмид, кодирующих соответствующие гидовые РНК, и провести отбор нужных клонов.

Второй путь решения возможности модификации исследуемого CARE промотора включает в себя использование линии *A. thaliana* SALK_084897, не экс-

прессирующей ген *AOX1a*, а также плазмиды рH2GW7 (Karimi et al., 2002) [11], пригодной для клонирования копии гена с нативным и модифицированным промотором и агробактериальной трансформации мутантных растений. Выбранный нами вектор рассчитан для Gateway клонирования и содержит CaMV 35S промотор для экспрессии вставляемого гена (или *ccdB* для недопущения роста колоний без вставки). Для формирования вставки в конструкцию гена с собственным промотором будет применен классический способ вырезания CaMV 35S промотора и *ccdB* с помощью рестриктазы *FriOI* («Сибэнзим», Россия) с образованием некомплементарных липких концов AGCT-3' и 5'-CCGG.

Ген *AtAOX1a* имеет очень короткие интроны, что позволяет скопировать его из генома вместе с промотором, не прибегая к реконструкции из кДНК. Для копирования из генома линии Col-0 и последующего процессинга концов

с помощью рестриктазы BstXI (Сибэнзим, Россия) необходимо использовать праймеры: прямой 5'-CGACTC CATGGCCATGGAATAAAACTTTTACAAACCCAA GGC-3' (AtAOX1a_f_BstXI) и обратный 5'- AGTTCG CAGAGCTCTGGGCCCTGAAAGAAAATATAGCC CC-3' (AtAOX1a_r_BstXI). Копирование будет осуществлено с помощью высокоточной полимеразы во избежание внесения нежелательных мутаций. Полученный продукт длиной 3279 можно использовать для клонирования в плазмиду pH2GW7 с целью последующей агробактериальной трансформации в мутантов *A. thaliana* SALK_084897 и, соответственно, создания контрольных растений с восстановленной экспрессией нативного *AtAOX1a*. Для того чтобы скопировать ген с собственным промотором и одновременно внести точечные мутации, возможно использовать праймеры с частичной некоплементарностью в сайтах CAREs. Для этого будут проведены две ПЦР-реакции для амплификации двух фрагментов гена, пересекающихся в зоне модификации (рис. 2). В качестве «внутренних» праймеров для внесения мутации в сайтах CAREs следует использовать прямой: 5'-CCTATGTCATAGTCTCATTT ACATCTCTATGAAGAGTTTTTCGATCATCAACC-3' (в паре с AtAOX1a_r_BstXI) и обратный 5'- CATAGA GATGTAATGAGACSTATGACATAGGTATAAAGT ATAACAGTTTTTC-3' (в паре с AtAOX1a_f_BstXI). Полученные продукты необходимо очистить с помощью агарозного гель-электрофореза, а затем гибридизовать их друг на друга с последующей элонгацией с помощью той же высокоточной полимеразы. Для того чтобы гибридизация областей гомологии двух ампликонов произошла эффективно, надо удалить негативную цепь первого и позитивную цепь второго ампликона. Это возможно сде-

лать, если при их амплификации использовать внутренние праймеры, предварительно фосфорилированные с 5' конца полинуклеотидкиназой («Сибэнзим», Россия), а перед элонгацией обработать ампликоны лямбда экзонуклеазой («New England Biolabs», США), расщепляющей только 5'-фосфорилированные нити ДНК. Результатом элонгации станет линейный конструктор, кодирующий ген *AtAOX1a* с собственным промотором и точечными мутациями в элементах I1, G-box и I2. Как и в случае немодифицированной копии гена, концы конструктора адаптированы для процессинга с помощью рестриктазы BstXI с образованием липких концов, комплементарных концам раскрытой с помощью эндонуклеазы FrioI плазмиды pH2GW7.

В результате клонирования будет получена плазмида, пригодная для агробактериальной трансформации *A. thaliana* линии SALK_084897 с последующим отбором гигромицин-устойчивых клонов. Одновременно будут созданы клоны со сходной, но немодифицированной копией гена *AtAOX1a*.

В планируемых исследованиях влияния модификации I1, G-box и I2 элементов в промоторе гена *AtAOX1a* на регуляцию экспрессии данного гена и связанных с этим изменений в физиологии и стресс-ответе растений следует учитывать место самой инсерции конструкции в геном. Это можно сделать двумя способами. Первый заключается в высокопроизводительном секвенировании генома клонов с низким покрытием, достаточным только для картирования места встройки T-DNA. По результатам такого картирования можно отобрать клоны, в которых инсерция не затронула жизненно важных генов. Второй подход — использовать выборки из нескольких клонов (10 и более), чтобы нивелировать вклад случайной инсерции статистическим путем.

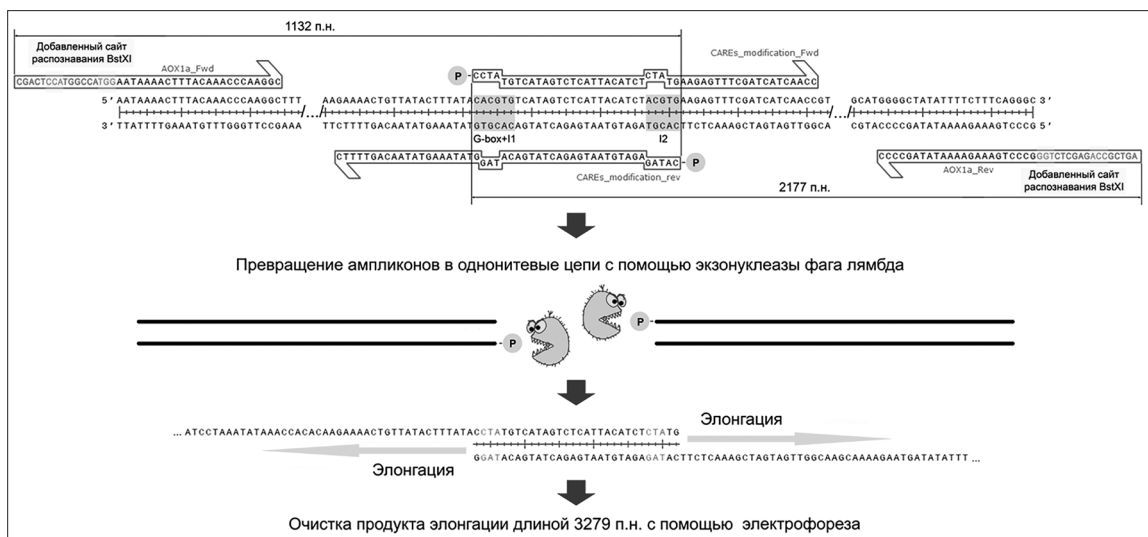


Рис. 2. Схема ПЦР-модификации гена *AOX1a* с нативным промотором. Показано разрушение G-box, I1 и I2 регуляторных элементов и добавление адаптеров для клонирования конструкции в плазмиду для агробактериальной трансформации

Заключение

Успешная модификация промотора *AtAOX1a*, а также сравнение классического (внесение предварительно модифицированной копии гена в мутантную линию) и современных подходов (с помощью CRISPR/Cas технологии) позволит разработать и предложить четкие универсальные инструкции разных вариантов внесения точечных мутаций в геном растений для изучения механизмов транскрипционного контроля экспрессии *AOX1a* и, возможно, других целевых генов, играющих ключевую роль в метаболизме растительной клетки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00476 А.

Литература

1. *Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H., de Melo D.F.* AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? // *Trends Plant Sci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 281–287.
2. *Cao Y., Li H., Pham A.Q., Stacey G.* An improved transient expression system using *Arabidopsis protoplasts* // *Curr. Protoc. Plant Biol.* – 2016. – Vol. 1(2). – P. 285–291.
3. *Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J.* Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 58. – P. 193–212.
4. *Dinakar C., Raghavendra A.S., Padmasree K.* Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: Role of pyruvate and malate in activating of AOX // *Physiol. Plant.* – 2010. – Vol. 139(1). – P. 13–26.
5. *Dojcinovic D., Krosting J., Harris A.J., Wagner D.J., Rhoads D.M.* Identification of a region of the *Arabidopsis AtAOX1a* promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 58. – P. 159–75.
6. *Garmash E.V., Grabelnych O.I., Velegzhaniniv I.O., Borovik O.A., Dalke I.V., Voinikov V.K., Golovko T.K.* Light regulation of mitochondrial alternative oxidase pathway during greening of etiolated wheat seedlings // *J. Plant Physiol.* – 2015. – Vol. 174. – P. 75–84.
7. *Garmash E.V., Velegzhaniniv I.O., Grabelnych O.I., Borovik O.A., Silina E.V., Voinikov V.K., Golovko T.K.* Expression profiles of genes for mitochondrial respiratory energy-dissipating systems and antioxidant enzymes in wheat leaves during de-etiolation // *J. Plant. Physiol.* – 2017. – Vol. 215. – P. 110–121.
8. *Hahn F., Eisenhut M., Mantegazza O., Weber A.P.M.* Generation of targeted knockout mutants in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR/Cas9 // *Bio Protocol.* – 2017. – Vol. 7. – doi:10.21769/BioProtoc.2384.
9. *Hess G.T., Tycko J., Yao D., Bassik M.C.* Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes // *Mol. Cell.* – 2017. – Vol. 68(1). – P. 26–43. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.029.
10. *Ho L.H.M., Giraud E., Uggalla V., Lister R., Clifton R., Glen A., Thirkettle-Watts D., Aken O.V., Whelan J.* Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 147. – P. 1858–1873.
11. *Karimi M., Inzé D., Depicker A.* Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation // *Trends Plant Sci.* – 2002. – Vol. 7(5). – P. 193–195.
12. *Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L.* The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 8271–8276.
13. *Menkens A.E., Schindler U., Cashmore A.R.* The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – Vol. 20(12). – P. 506–510.
14. *Nishida K., Arazoe T., Yachie N. et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems // *Science.* – 2016. – 353(6305):aaf8729. doi:10.1126/science.aaf8729.
15. *Noguchi K., Yoshida K.* Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves // *Mitochondrion.* – 2008. – Vol. 8. – P. 887–899.
16. *Polidoros A.N., Mylona P.V., Arnholdt-Schmitt B.* Aox gene structure, transcript variation and expression in plants // *Physiol. Plant.* – 2009. – Vol. 137. – P. 342–353.
17. *Selinski J., Scheibe R., Day D.A., Whelan J.* Alternative oxidase is positive for plant performance // *Trend. Plant. Sci.* – 2019. – Vol. 23(7). – P. 588–597. doi: 10.1016/j.tplants.2018.03.012.
18. *Tepperman J.M., Hudson M.E., Khanna R., Zhu T., Chang S.H., Wang X., Quail P.H.* Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation // *Plant J.* – 2004. – Vol. 38. – P. 725–739.
19. The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 796–815.
20. *Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J.* Alternative oxidase: a target and regulator of stress response // *Physiol. Plant.* – 2009. – Vol. 137(4). – P. 354–361.
21. *Vanlerberghe G.C., McIntosh L.* Alternative oxidase: from gene to function // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 48. – P. 703–734.

22. Vanlerberghe G.C., Cvetkovska M., Wang J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? // *Physiol. Plant.* — 2009. — Vol. 137. — P. 392–406.
23. Wang P., Hendron R.-W., Kelly S. Transcriptional control of photosynthetic capacity: conservation and divergence from *Arabidopsis* to rice // *New Phytol.* — 2017. — Vol. 216. — P. 32–45.
24. Zhang D.-W., Xu F., Zhang Z.-W., Chen Y.-E., Du J.-B., Jia S.-D., Yuan S., Lin H.-H. Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings // *Plant Cell Environ.* — 2010. — Vol. 33. — P. 2121–2131.
25. Zhong Z., Sretenovic S., Ren Q., Yang L., Bao Y., Qi C., Yuan M., He Y., Liu S., Liu X., Wang J., Huang L., Wang Y., Baby D., Wang D., Zhang T., Qi Y., and Zhang Y. Improving plant genome editing with high-fidelity xCas9 and non-canonical PAM-targeting Cas9-NG // *Mol. Plant.* — 2019. — Vol. 12. — P. 1027–1036.

DESIGN OF INSTRUCTIONS FOR POINT MUTATIONS INTRODUCING INTO THE MITOCHONDRIAL ALTERNATIVE OXIDASE GENE PROMOTER OF *ARABIDOPSIS THALIANA AOX1a*

I.O. VELEGZHANINOV, E.S. BELYKH, E.V. GARMASH

Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

Based on modern genome editing technologies, variants of modifications of the mitochondrial alternative oxidase gene promoter of *Arabidopsis thaliana AOX1a* have been proposed to study the role of the light-responsive cis-regulatory elements (CAREs) of the gene promoter in the regulation of its expression. Two strategies for introducing point mutations into closely spaced CAREs — CACGTG (G-Box and I1 element) (96–93 bp upstream of the transcriptional start site, TSS) and ACGTG (I2 element) (73–69 bp upstream of the TSS) were developed. The first option involves using the CRISPR/Cas base editing system in a wild ecotype plant (Col-0). The second strategy is to modify the AtAOX1a promoter copied from the genome of wild-type plants (Col-0), and thus transform the genome of the T-DNA insertional (knockout) line for *AOX1a* (SALK_084897). The possible risks and benefits of both point mutation strategies are discussed.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, alternative oxidase, *AtAOX1a*, promoter, point mutations, cis-regulatory elements, CRISPR/xCas.

РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* И ЕГО ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Б.О. РОИК*, М.М. НАУМОВ

ФГБОУ ВО «Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И.И. Иванова», Курск

Разработан и представлен один из авторских способов получения ветеринарного нуклеинового препарата, который был экстрагирован из биомассы зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris*. Количественные и качественные характеристики данного препарата были определены общедоступными физико-химическими методами, адаптированными под данную матрицу. Для экстракции нуклеиновых кислот из зеленых микроскопических водорослей хлореллы использовался самостоятельно изготовленный, классический биореактор, состоящий из трехлитровой колбы на 500 см³, спирального вертикального холодильника Димрота, роторной лопастной мешалки и контроллера температуры внутри реакционной смеси. Конструкция биореактора отвечает всем поставленным в ходе работы целям и задачам, а также обеспечивает надлежащее качество конечного продукта на выходе. Для получения качественных и количественных параметров препарата в работе применялся модифицированный нами колориметрический метод количественного и качественного определения нуклеиновых кислот по специфическим цветным реакциям на дезоксирибозу и рибозу. Особенностью улучшенного колориметрического метода являлось то, что для измерения оптической плотности окрашенных растворов, содержащих молекулы ДНК или РНК, применялся микропланшетный фотометр-ридер для проведения иммуноферментного анализа (ИФА). При этом определение концентрации нуклеиновых кислот проводилось не в стандартных кварцевых кюветках (Q10), а в совершенно идентичных по светопропускаемости химически чистых микрокюветках, совмещенных в планшет для 96 образцов. Перспективным и современным биологически возобновляемым и легко культивируемым ресурсом являются экологически чистые зеленые микроводоросли рода *Chlorella vulgaris* и наряду с известными источниками нуклеиновых кислот могут быть использованы для получения препаратов на основе ДНК и РНК.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, *Chlorella vulgaris*, препараты ДНК и РНК, биотехнология, ветеринария, микроводоросли, биопрепараты.

Введение

Одним из перспективных направлений биомедицинской промышленности в настоящее время является разработка недорогих, эффективных и фармакологически обоснованных лекарственных препаратов, а также биологически активных веществ на основе природных компонентов. Такие вещества, как нуклеиновые кислоты, эффективно стали применяться в ветеринарии и животноводстве при лечении многих заболеваний животных. Данные препараты достаточно хорошо зарекомендовали себя как средства иммунологического и противовирусного действия, применяемые в лечебно-профилактических целях.

Перспективным сырьем для получения нуклеиновых препаратов в виде нуклеината натрия служат молоки лососевых и осетровых рыб, а также хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [6, 14]. Однако, наряду с известным количеством биоресурса существуют и другие, весьма интересные по своей природе биологические источники нуклеиновых кислот. Изолирование нуклеиновых кислот представляется возможным практически из любых типов клеток и тканей органической природы, при этом ДНК в основном содержится в ядрах, а РНК распределена по всему объему клетки.

В последнее время особое внимание сосредоточено на иммуностимулирующих препаратах, основу которых составляют нуклеиновые кислоты [1, 3–5, 8, 13].

Особенность выбора такого биоресурса нуклеиновых кислот, как микроводоросль *Chlorella vulgaris*, основывается на ее богатом биохимическом составе [11]. Уникальным свойством этой микроводоросли представляется иммуномодулирующий эффект, который проявляется при употреблении ее в пищу или в качестве

© 2020 г. Роик Б.О., Наумов М.М.

* Автор для переписки:

Б.О. Роик, аспирант кафедры физиологии и химии им. профессора А.А. Сысоева, ФГБОУ ВО «Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И.И. Иванова», Курск

E-mail: bogdan.bioCHEM.roik@mail.ru

кормовой добавки в основной рацион животных. В свою очередь, хлорелла обладает одновременно функциями растительного и животного организма, поэтому содержит в своем составе достаточное количество ДНК и РНК. Иммунологические свойства микроводоросли обусловлены наличием нуклеиновых кислот, расположенных в ядре и по объему цитоплазмы [10, 15]. Следовательно, качественный и количественный нуклеиновый состав полностью зависит от видового и родового происхождения таких микроводорослей, как хлореллы, равно как и других представителей царства, что определяет актуальность и перспективы в исследованиях данной научной области.

Целью работы являлись разработка способа экстракции нуклеиновых кислот из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*, получение препарата в виде нуклеината натрия и оценка качественных и количественных характеристик.

Материалы и методы

Основное оборудование и реактивы: лабораторный вытяжной шкаф «ЛАБ-ПРО-ШВ 150/70(80) TR,FR-20(26)», (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия); весы электронные лабораторные («ОНАУС», США); микропланшетный фотометр «Infinite F50» («ТЕСАН», Австрия GmbH); 96-микролуночные одноразовые пластиковые планшеты для планшетного фотометра или ИФА-анализатора; лабораторная центрифуга «CENTRIFUGE CM-6M», (ELMI, Латвия); центрифужные пробирки с крышками объемом 50 см³, (Nunc, Дания); высокая химическая стеклянная емкость на 1,5–2 литра; натрия хлорид, ГОСТ 4233-77 (Россия); натрий лимоннокислый 5,5-водный, ГОСТ 22280-76 (Россия); хлорная кислота, ГОСТ 6552-80 (НСlO₄, АО «Лен Реактив», Россия); вода дистиллированная, ГОСТ Р 58144-2018 (Россия); этиловый спирт, ГОСТ 18300-72, (Россия); изоамиловый спирт, ГОСТ 5830-79 (ЗАО «База № 1 Химреактивов», Россия); ацетон, ГОСТ 2603-79 (АО «Вектон», Россия); проявляющий (ДНК) реактив дифениламин, ТУ 6-09-5467-90 (C₁₂H₁₁N, «Лен Реактив», Россия); проявляющий (РНК) реактив орцин, Product №29418 (CH₃×C₆H₃(OH)₂×H₂O, «Laboratory BDH Reagent», England); стандартный образец D-рибозы («BioChem», Франция); стандартный образец 2-D-Дезоксирибозы, («BioChem», Франция); сухая биомасса микроводорослей *Chlorella vulgaris* (Китай).

Все использованные в работе реагенты имели квалификацию «чда» или «хч». Приборы и оборудование на момент проведения исследований имели соответствующую поверку и были полностью исправны, а также соответствовали надлежащей квалификации.

Биореактор. Изготовленная установка биореактора для решения поставленной цели имеет следующие составляющие, надежно закрепленные на металлическом корпусе: колбонагреватель «LT-500», для колбы на 500 см³ (ЛабТех, Россия); трехгорлая круглодонная реакционная колба для гидролиза на 500 см³, (ACROS, Россия); спиральный холодильник Димрота «ХСВ 400» (Прайм Кемикалс Групп, Россия); термометр высокотемпературный до 300 °С (Россия); электродвигатель с ротором для вращения лопастной мешалки. Корпус биореактора состоит из металлических профильных труб (А=20 мм, Н=20 мм, В=1,5 мм), скрепленных при помощи сварочного инверторного аппарата (РЕСАНТА САИ-160ПН; электроды № 3 «Монолит») с соблюдением стыковых, угловых и тавровых типов сварных соединений [12].

Особенностью конструкции каркаса биореактора является то, что при установке колбонагревателя другого диаметра можно увеличивать объем реакционной колбы. Таким образом, на корпус биореактора, в зависимости от необходимого объема, устанавливаются колбонагреватели, такие как «ЛН-210» (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия) — для колб объемом до 2000 см³ и «ПЭ-4100 М» (ЭКРОС, Россия) — для колб объемом от 250 до 1000 см³, что обеспечивает масштабирование процесса. Эксплуатация биореактора проводилась с соблюдением правил безопасности в вытяжном шкафу «ЛАБ-ПРО-ШВ 150/70(80) TRFR-20(26)» (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия). В рамках разработанного процесса установка биореактора соответствовала критериям квалификации оборудования по основным этапам проверки IQ, OQ, PQ, DQ, что определялось в правильной работе и обеспечении надлежащей точности, установленных параметров и ожидаемых результатах. Во время процесса экстракции колба и все соединения узлов являлись герметичными. Конструкция и характеристики изготовленного биореактора позволяют проводить любые несложные виды гидролиза и экстракции.

Цитратно-солевой раствор для экстракции (ρН=7). В мерную колбу на 500 мл помещалась навеска 100 г натрия хлорида и 5 г натрия цитрата. Далее в колбу вносили 200 мл дистиллированной воды и ставили

на ультразвуковую баню до полного растворения соли, затем раствор доводится до метки водой. Солевой раствор использовался при экстракции нуклеината натрия в необходимом объеме.

Реагенты для селективной окраски дезоксирибозы и рибозы. Данные реагенты используются в селективных реакциях на углеводные мономеры ДНК и РНК как проверка качественных показателей, так и при количественном определении содержания нуклеиновых кислот в препарате [2, 7].

Орциновый реактив для определения рибозы в нуклеинате натрия: 1,0 г орцина (орцинол, 5-метилрезорцин) растворить в 500 см³ 30%-ной соляной кислоты, добавить 5 мл 10%-ного хлорного железа. Реактив следует хранить в темной склянке и плотно закрытым, во избежание испарения кислоты.

Реактив Дише для определения дезоксирибозы в нуклеинате натрия: 1,0 г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70%-ного этанола, растворить в 100 см³ ледяной уксусной кислоты и добавить 2,75 см³ серной кислоты.

Калибраторы. Приготовление градуировочных растворов основывалось на получении окрашенных комплексов углеводных мономеров нуклеиновых кислот для определения количественного содержания ДНК и РНК в гидролизате. Вначале готовились растворы дезоксирибозы и рибозы с концентрациями 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0 мг/см³, используя коммерческие порошковые препараты. Затем при помощи специальных реактивов (Дише и орцина) получали окрашенные соединения мономеров ДНК и РНК соответственно.

Подробное описание процесса проведения реакций со стандартными образцами и гидролизатом полученного нуклеинового препарата, а также результаты количественных и качественных определений представлены в следующем разделе «Результаты и обсуждение».

Результаты и обсуждение

Биохимический состав альгологически чистой микроводоросли *Chlorella vulgaris* (размеры клеток от 2 до 10 мкм) весьма разнообразен и содержит порядка 70 важных и полезных веществ, в том числе ДНК и РНК. Поэтому нами был использован данный биоресурс в технологии получения препарата на основе нуклеиновых кислот. Для максимального извлечения нуклеиновых кислот из такого биоматериала, как микроводоросль хлорелла, необходимым условием было полное разрушение прочных клеточных мембран,

целлюлозной оболочки и стенок ядра клетки. Таким образом, при подготовке биоматериала к экстракции применялся как механический лизис клеток (перетирание, измельчение), так и химический с использованием детергента (додецилсульфат натрия). Воздействие высокой температуры или физического лизиса клеток были использованы в ходе экстракции нуклеиновых кислот. Следует понимать, что подобный биоматериал (микроорганизмы, растения) содержит пигменты, липиды, полисахариды и другие мешающие компоненты, которые должны быть удалены от выделенной нуклеиновой кислоты. Многие вещества содержатся в целлюлозной клеточной оболочке и после проведения гидролиза удаляются вместе с отработанным органическим материалом при помощи центрифуги. Более того, если нет необходимости в получении цельных фрагментов ДНК и РНК, как в случае ПЦР-анализа, то одновременное применение различных видов лизиса клетки для выделения препаративных нуклеиновых кислот необходимо осуществлять уже к лиофилизированному биоматериалу. В этом случае ферментативный распад под действием нуклеаз отсутствует, так как лиофилизация биоматериала обеспечит сохранение нативных свойств ДНК и РНК. При использовании додецилсульфата натрия (SDS) в качестве детергента, разрушающего клеточные мембраны, можно обеспечить одновременное удаление белковых, липидных, пигментных и других молекул из клетки.

Методика эксперимента. Был разработан и освоен авторский способ экстракции нуклеиновых кислот из биомассы зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* с получением конечного продукта в виде бело-бежевого порошка нуклеината натрия с необходимыми физико-химическими параметрами, что определялось соответствующими методами анализа.

50±0,1 г сухой лиофилизированной биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* помещали в глубокую емкость и осторожно добавляли 10 см³ охлажденной до 2 °С 0,5 н. хлорной кислоты. В течение 5 минут энергичным перемешиванием промывали клеточную массу, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об./мин. Надосадочную жидкость, содержащую кислоторастворимые вещества, отбрасывали. К полученной гомогенной массе добавляли этиловый спирт, для повторной отмывки, перемешивали в течение 5 минут. Этиловый спирт, который экстрагировал присутствующие пигменты и липиды, отделяли центрифугой в течение 10 минут при 3500 об./мин. Таким образом, биомасса микроводорослей была готова к экстракции нуклеиновых кислот.

Для этого подготовленную биомассу *Chlorella vulgaris* полностью декантировали в трехгорлую круглодонную колбу биореактора, смывая осадок с емкости 400 мм³ цитратно-солевым раствором, смешанных в пропорции 1:1 по объему, рН=7. Добавляли к смеси 40 мм³ детергента (SDS, натрия додецилсульфата) с концентрацией 100 мл/дм³ для дополнительного лизиса прочных клеточных мембран и стенок ядра, затем 10 см³ изоамилового спирта — для депротенизации клеточной массы. Натрия цитрат применялся в процессе гидролиза как ингибитор ДНКазы.

Нагревали смесь до 100 °С, медленно, в течение 40–60 минут. Затем в течение 2 часов выдерживали при температуре кипения с перемешиванием субстанции через каждые 10 минут. При данном процессе толстая целлюлозная клеточная стенка хлореллы и оболочка ядра разрушаются под действием высокой температуры и добавленных реагентов. Основная часть белка под действием изоамилового спирта и высокой температуры денатурирует и образуется в осадке с клеточным шламом.

По окончании процесса полученную смесь остуживали до комнатной температуры. Добавляли 100 см³ цитратно-солевого раствора, перемешивали, обрабатывали смесь ультразвуком, затем центрифугировали и надосадочную жидкость, содержащую нуклеиновые кислоты и часть белка, переносили количественно в высокую емкость. Денатурированный белок с клеточным шламом, отделенные центрифугированием, также могут быть использованы в качестве пищевой добавки в рацион животных, соответственно после проведения дополнительной отмывки, сушки и перетирания в порошок.

Осаждение нуклеината натрия в виде хлопьев осуществлялось по принципу широко распространенного метода агрегации молекул ДНК и РНК в присутствии высокой концентрации соли и органического растворителя, в условиях низкой температуры, при изменении рН гидролизата. Осадителем в данном случае являлся ацетон, но также можно использовать этиловый и изопропиловый спирты при разных соотношениях. Далее определяли объем полученного гидролизата и подготавливали высокую емкость, в которой находился охлажденный до 1–3 °С ацетон. Соотношение объемов ацетона к гидролизату было определено как 1:2. Далее помещали емкость в морозильную камеру на 4 часа.

Образовавшиеся в осадке хлопья нуклеиновых кислот собирали центрифугированием. Промывали осадок 70% этиловым спиртом, а затем осушивали в токе инертного газа в лабораторном концентраторе. Полученный остаток измельчали до состояния мелкодисперсного

порошка. В условиях длительного хранения препарат нуклеинат натрия хранят при низкой температуре, поместив в 70%-ный этиловый спирт. При формировании лекарственного препарата следует избавиться от спирта (лиофилизировать, высушить в токе инертного газа) и перерастворить в физрастворе для клинического применения.

Отработанный клеточный шлам, после отмывки этиловым спиртом и водой, высушенный и перетертый в порошок, содержащий большую часть денатурированного белка, может быть использован в животноводстве как белковая добавка к общему рациону.

Характеристики полученного препарата. Полученный препарат представляет собой бело-бежевого цвета мелкодисперсный аморфный порошок, не имеющий запаха после стадий отмывки и сушки. Выход нуклеината натрия (предполагаемые торговые непатентованные названия AlgaeNat, AlgaeDNA, GreenNat AlgaZ, Greener NUC) после сушки в токе воздуха и взвешивания на электронных весах с погрешностью ±0,0002 г в массовых соотношениях составлял 6,0 г из навески 50,0 г сухой биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*.

Электрофоретическим анализом определено, что препарат нуклеиновых кислот из хлореллы имеет молекулярную массу от 350 до 400 кДа. При этом известно, что в классической медицине и фармации используют препараты ДНК и РНК с молекулярной массой в пределах 200–500 кДа. Данный препарат создан преимущественно для животных. Гиперхромный эффект не менее 37%. При помощи гидролиза устраняется гипохромизм. Препарат плохо растворим в органических растворителях и воде (наблюдается неполное растворение и коагуляция крупинок нуклеиновых кислот), при этом достаточно хорошо растворим в 5–8%-ном растворе водного натрия хлорида с рН 7–8. Содержание и прирост КРФ в данном препарате не учитывался.

Содержание ДНК и РНК в препарате определялось по специфическим цветным реакциям с применением реактивов Дише и ордина соответственно, с последующим измерением оптической плотности окрашенных растворов методом колориметрического анализа. Нами был разработан и апробирован совершенно иной подход к измерению количества нуклеиновых кислот наряду с известными методами фотометрического анализа [9]. В работе использовался фотометр для иммуноферментного анализа с микроюветами, которые были помещены в ячейки 96-луночного планшета. По оптическим характеристикам расхождений в измерениях от классических

кварцевых кювет не наблюдалось. При использовании ИФА-фотометра в противовес приборам типа ФЭК или КФК расхождений с результатами сравнительных измерений и разного рода погрешностей не наблюдалось. Определение ДНК и РНК проводилось в объеме 200 мм³ окрашенного раствора, после чего был осуществлен расчет количества нуклеиновых кислот.

Подготовка калибраторов и гидролизата к измерению. Перед колориметрическим анализом все приготовленные стандартные растворы, в том числе кислотный гидролизат полученного препарата, проходили стадию специфических реакций, в ходе которых селективные реагенты окрашивали молекулы ДНК в синий цвет, а молекулы РНК — в зеленый [2, 7]. Таким образом, к 1,0 см³ каждого раствора стандарта ДНК и РНК добавляли по 1,0 см³ хлорной кислоты и кипятили в течение 20 минут при 100 °С. К препарату в количестве 1 г добавляли 10 см³ хлорной кислоты, гидролизовали при тех же условиях. Далее проводили соответствующие специфические реакции [2, 9]. Измерение окрашенных растворов стандартов ДНК и РНК, а также окрашенного гидролизата с целью определения содержания рибозы и дезоксирибозы проводили с использованием светофильтра 620 нм. На основании построенной градуировочной зависимости для нуклеиновых кислот содержание ДНК в препарате около 76%, РНК — примерно 22%, содержание белка — не более 2%.

Полученный нами ветеринарный нуклеиновый препарат имеет соответствующую фармакопейную чистоту, которая была определена спектрофотометрическим методом (А.А. Спириин) [2]. Так как препарат содержит ДНК и небольшую часть РНК, то по соотношению поглощения длин волн 260–230 нм имеет коэффициент 1,9. Следует заметить, что чистым считается нуклеиновый препарат, который в данном соотношении длин волн находится в интервале от 1,8 до 2,2. Результаты меньших значений коэффициента, полученного в соотношении 260/230 нм, свидетельствуют о контаминации препарата вследствие процедуры гидролиза, например, белком или углеводными компонентами.

Таким образом, нами была разработана и апробирована технология получения нуклеината натрия из совершенно нового источника нуклеиновых кислот такого, как зеленые микроводоросли *Chlorella vulgaris*. В ходе проведенных исследований на острую токсичность препарата в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ № 755 от 12.08.77), полученного по разработанному и представленному способу, гибели и

отрицательного влияния на организм животных не наблюдалось. Препарат малотоксичен ($LD_{50} > 1,9$ г/кг).

Заключение

На основании проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. Разработанный способ выделения нуклеиновых кислот является оптимальным и обоснованным для данного типа сложного биологического материала, такого как клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

2. Полученный нами препарат на основе нуклеиновых кислот из клеточной биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* по представленному нами способу отвечает необходимым требованиям, предъявляемым к данному типу препаратам.

3. Полученный препарат из микроводорослей является безопасным, имеет идентичный эффект при сравнении с аналогичными препаратами, полученными из другого биологического ресурса.

4. Для получения препаратов на основе нуклеиновых кислот перспективным биологически возобновляемым и легко культивируемым ресурсом являются экологически чистые зеленые и сине-зеленые микроводоросли.

Конфликт интересов. Данная работа не имеет конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность кандидату ветеринарных наук, руководителю областного бюджетного учреждения «Курская областная ветеринарная лаборатория» Ермилову И.В. за предоставленную базу для проведения эксперимента и ряда аналитических исследований.

Литература

1. Беседнова Н., Эпштейн Л.М. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из молок рыб — перспективы клинического применения (в помощь практическому врачу). — Владивосток, 2002.
2. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие / сост. М.Г. Кусакина, В.И. Суворов, Л.А. Чудинова; Пермский ГНИУ. — Пермь, 2012. — 148 с.
3. Воронин С., Гуменюк А., Ханис А., Фёдоров Ю. Натрия нуклеинат — эффективный иммуномодулятор // Животноводство России. Секция Ветеринария. — 2015. — № 7 — С. 21.

4. Каплина Э.Н., Вайнберг Ю.П. Деринат — природный иммуномодулятор для детей и взрослых. — М.: Научная книга, 2004. — 186 с.
5. Каплина Э.Н. Использование препарата Деринат в различных областях медицины // Материалы 1-й Всероссийской конференции. — М., 2000. — С. 47.
6. Касьяненко Ю.И., Ковалева Ю.В., Эпштейн Л.М., Артюков А.А. Получение и свойства природных ДНК из молок лососевых. — Владивосток: Известия ТИПРО-центра. — 1997. — № 120. — С. 37–43.
7. Нуклеиновые кислоты: методические указания / Сост. В.А. Шадрикова, В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. — Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2014. — 23 с.
8. Пашук Л.К., Апрышко Г.Н., Трещалина Е.М. Препараты ДНК как потенциальные терапевтические средства // Химико-фармацевтический журнал. — 1995. — Т. 29. — № 6. — С. 61–64.
9. Роик Б.О., Наумов М.М. Выделение нуклеиновых кислот из клеточной биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* и определение их количества фотоколориметрическим методом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2020. — Т. 23(1). — С. 36–41.
10. Роик Б.О., Наумов М.М. Микроводоросль рода *Chlorella vulgaris* в технологии получения нуклеиновых кислот / Материалы конференций ГНИИ «НАЦРАЗВИТИЕ». Август 2018. Часть II: Сборник избранных статей. — СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2018. — 116 с.
11. Роик Б.О., Наумов Н.М., Лукьянов В.А., Наумов М.М. Биохимические показатели и аминокислотный состав кормовой добавки «Альгавет» // Интеграция науки и сельскохозяйственного производства: Материалы Международной научно-практической конференции. — Курск: КГСХА. — 2017. — Ч. 1. — С. 294–296.
12. Роик Б.О. Квалификация биореактора для получения нуклеината натрия из зеленых микроводорослей в условиях лаборатории / Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: Сборник тезисов II Международной научно-практической конференции. Москва, РУДН, 14 ноября 2019 г. — М.: РУДН, 2019. — 299 с.
13. Серебряная Н.Б., Новик А.А. ДНК как иммуностимулятор (обзор литературы) // Медицинская иммунология. — 2001. — Т. 3. — № 1. — С. 27–34.
14. Федянина Л.Н., Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. и др. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище на основе нуклеиновых кислот различного происхождения // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2007. — № 4. — С. 9–12.
15. Roik B.O., Naumov M.M., Semenyutin V.V. et al. Biotechnology for the production of veterinary drug Nucleinat sodium from microalgae // RJPBCS. — 2019. — Vol. 1. — No.10. — P. 779–786.

DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF A VETERINARY DRUG BASED ON NUCLEIC ACIDS OF THE GREEN MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* AND ITS MAIN CHARACTERISTICS

B.O. ROIK, M.M. NAUMOV

I.I. Ivanov Kursk State Agricultural Academy, Kursk

One of the author's methods of obtaining a veterinary nucleic acid preparation, which was extracted from the biomass of the green microalgae *Chlorella vulgaris*, has been developed and presented. The quantitative and qualitative characteristics of this drug were determined using generally available physicochemical methods, adapted to this matrix. For the extraction of nucleic acids from green microscopic algae of chlorella, a self-made, classic bioreactor was used, consisting of a three-branch flask of 500 cm³, a Dimroth spiral vertical refrigerator, a rotary paddle stirrer and a temperature controller inside the reaction mixture. The design of the bioreactor meets all the goals and objectives set during the work, and also ensures the proper quality of the final product at the exit. To obtain the qualitative and quantitative parameters of the preparation, we used a colorimetric method modified by us for the quantitative and qualitative determination of nucleic acids by specific color reactions to deoxyribose and ribose. A feature of the improved colorimetric method was that to measure the optical density of colored solutions containing DNA or RNA molecules, a microplate photometer-reader was used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the same time, the determination of the concentration of nucleic acids was carried out not in standard quartz cuvettes (Q10), but in chemically pure micro cuvettes, completely identical in light transmittance, combined into a plate for 96 samples. Ecologically clean green microalgae of the *Chlorella vulgaris* are a promising and modern biologically renewable and easily cultivated resource and, along with known sources of nucleic acids, can be used to obtain preparations based on DNA and RNA.

Keywords: nucleic acids, *Chlorella vulgaris*, DNA and RNA preparations, biotechnology, veterinary medicine, microalgae, biological products.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* В ПРОЦЕССЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А.И. ХОМЯК*, А.М. АСАТУРОВА, Т.М. СИДОРОВА, Н.А. ЖЕВНОВА

Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар

Исследована антифунгальная активность штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 в отношении фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (на примере *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6) в зависимости от времени культивирования в условиях шейкеров-инкубаторов. В процессе исследования обнаружено, что максимальная удельная скорость роста: 0,097 ч⁻¹ (24 ч) для *B. subtilis* BZR 336g и 0,04 ч⁻¹ (24 ч) для *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что оптимальным временем культивирования в условиях шейкеров-инкубаторов по критериям количества колониеобразующих единиц и антифунгальной активности являются 36–48 ч для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 24–36 ч для штамма *B. subtilis* BZR 517. Полученные данные могут быть использованы при разработке технологии производства биопрепаратов на основе исследуемых штаммов для защиты сельскохозяйственных культур от экономически значимых грибных болезней.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, периодическое культивирование, антифунгальная активность, биоавтография.

Введение

В связи с общемировой тенденцией экологизации сельского хозяйства и все более широким использованием продуктов органического земледелия роль биопрепаратов с каждым годом увеличивается [12]. Остается значимым и включение биопрепаратов в интегрированную защиту растений, что позволяет минимизировать использование химических пестицидов [16, 18].

В настоящее время остро встают задачи повышения конкурентоспособности биопрепаратов и обеспечения рынка новыми ресурсосберегающими технологиями [8]. Весьма актуальными представляются исследования, направленные на выделение высокоактивных штаммов микроорганизмов-антагонистов, совершенствование методов культивирования потенциальных интродуцентов, разработку и создание новых товарных форм биопрепаратов пролонгированного действия [4, 11, 24]. Разработка технологии получения биопрепарата служит основой для развития экономически эффективных методов в области проектирования, масштабирования, оптимизации и контроля биотехно-

логических процессов с целью повышения выхода биомассы или накопления определенных продуктов обмена веществ микроорганизмов, таких как антибиотики или ростстимулирующие вещества [15, 20].

Но следует отметить, что на стадии получения биопрепарата степень проявления полезных свойств метаболитов находится в прямой зависимости не только от индивидуальных особенностей штамма-продуцента, но и от условий получения целевого продукта [6, 21]. Время культивирования — один из ключевых параметров промышленного производства биопрепаратов, поскольку основная цель в производстве биопрепаратов заключается в получении максимума биомассы за минимальное время культивирования с достижением высокого экономического эффекта [1, 14]. Этот показатель может явиться в ряде случаев первостепенным, поскольку обычно описание развития микробной массы происходит в координатах «численность» — «время». При этом необходимо учитывать, что максимальный уровень синтеза метаболитов может приходиться на стационарную фазу или конец экспоненциального роста [2, 13, 22, 23]. Кроме того, эффективность биопрепарата определяется не только биоконтрольными свойствами штамма-продуцента, но и биологической активностью продуцируемых метаболитов.

Цель исследования — изучить антифунгальную активность штаммов бактерий *B. subtilis* — продуцентов биопрепаратов в зависимости от времени культивирования.

© 2020 г. Хомяк А.И., Асатулова А.М., Сидорова Т.М., Жевнова Н.А.

* Автор для переписки:

Хомяк Анна Игоревна

научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ФГБНУ ВНИИ биологической защиты растений

E-mail: homyakai87@mail.ru

Материалы и методы

Объекты исследования — новые штаммы-продуценты экспериментальных образцов биопрепаратов для защиты растений от экономически значимых грибных болезней *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из Биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов ФГБНУ «Все-российский научно-исследовательский институт биологической защиты растений» (ВНИИБЗР) — БРК «ГКЭМ» № 585858, тест-культура фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr. BZR 6.

В исследованиях использована материально-техническая база УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» (№ 671367).

Исследования в условиях шейкеров-инкубаторов. Инкубацию осуществляли в термостатированных системах культивации клеток New Brunswick Scientific Excella E25 (США) при 180 об./мин на оптимизированной питательной среде (ОПС) в условиях периодического культивирования (концентрации вносимых тестовых источников углерода и азота, а также состав питательной среды (ориг.) как элементы технологии получения новых биопрепаратов относятся к объектам, охраняемым в режиме коммерческой тайны ФГБНУ ВНИИБЗР). Периодическое культивирование осуществляли в конических колбах Эрленмейера (750 мл) с объемом питательной среды 300 мл и предварительным внесением маточной культуры с титром клеток $3,9 \pm 0,05 \times 10^8$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 336g и $4,1 \pm 0,01 \times 10^7$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 517 (2,0% от общего объема питательной среды). Культивирование осуществляли при температуре 25 °С, рН 7,0 — для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 30 °С, рН 7,0 — для штамма *B. subtilis* BZR 517 [10].

Пробы для анализа брали через 8, 16, 24, 36, 48 и 72 ч от начала культивирования. Образцы анализировали по критериям антифунгальной активности и количества микробных клеток — колониеобразующих единиц (КОЕ). Антифунгальную активность штаммов определяли модифицированным методом последовательных разведений [3]. Тесты проводили в чашках Петри (ЧП). Для очистки от клеток бактерий жидкую культуру (ЖК) осаждали на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) в течение 30 мин (10000 об./мин) при 15 °С и пропускали через мембранный фильтр марки «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм.

Далее ЖК вносили в ЧП по 1,0 мл, добавляли по 9 мл охлажденной до 37,0–40,0 °С агаризованной ОПС и давали застыть. Инокулировали поверхность среды тест-культурой гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 на агаровых блоках. Антифунгальное действие исследуемых бактериальных штаммов, выраженное в процентах, определяли по скорости роста тест-культуры в сравнении с контролем при температуре 26,0 °С. Контроль — патоген, посеянный на твердую питательную среду с добавлением 1,0 мл стерильной ОПС. Учеты проводили каждые 24 ч. Степень ингибирования роста мицелия патогена определяли по формуле [17]:

$$И = (1 - (A/B)) \times 100,$$

где И — ингибирование роста мицелия патогена, %;

А — рост гриба в варианте, мм;

В — рост гриба в контроле, мм.

Определение числа клеток ЖК осуществляли методом Коха с посевом на мясо-пептонный агар [7]. Подсчет выросших колоний осуществляли с использованием системы для автоматического подсчета колоний Color Qcount, Spiral Biotech (США).

Максимальную удельную скорость роста в экспоненциальной фазе рассчитывали по формуле [5]:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln \%_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0},$$

где X_0 и X_1 — значения биомассы, соответствующие времени роста t_0 и t_1 .

Хроматографические и биоавтографические исследования. Исследования антифунгальной активности бактериальных метаболитов проводили с применением метода хроматографии этилацетатных экстрактов ЖК штаммов, выращенных при различных сроках культивирования. Для этого микробные компоненты осаждали на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) в течение 30 мин (10000 об./мин) при 15 °С. Надосадочную жидкость экстрагировали тремя объемами этилацетата. После упаривания этилацетата сухой остаток растворяли в минимальном количестве растворителя и хроматографировали с использованием в качестве неподвижной фазы тонкослойные хроматографические пластины (толщина слоя 2 мм) Kieselgel 60 фирмы Merck (Германия). Подвижной фазой служила система растворителей этилацетат-этанол-вода 40:15:15. Жидкость на пластинах разгоняли на высоту 12 см,

а затем анализировали в боксе с ультрафиолетовой лампой GAMAG (Швейцария) при $\lambda=366$ нм. Антифунгальную активность выделенных компонентов оценивали методом биоавтографии [9] с применением в качестве тест-культуры гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6. Для этого хроматографические пластины после пропитывания картофельно-глюкозной средой засеивали суспензией пропагул тест-гриба. Пластины помещали во влажную камеру при температуре $+28$ °С, время инкубации 48 ч. Степень фунгитоксичности метаболитов оценивали визуально по площади зон ингибирования роста тест-гриба на биоавтограммах. В качестве стандартов для противогрибковых липопептидов использовали коммерческие реагенты сурфактин и итурин А (компания Sigma-Aldrich).

Опыты проводились в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 10 и Microsoft Office Excel 2016.

Результаты и обсуждение

В процессе культивирования исследуемых штаммов в условиях шейкеров-инкубаторов отмечено, что лаг-фаза начиналась после внесения в среду маточной культуры и продолжалась до 8 ч (рис. 1). В этот период микробные клетки не используют субстрат, но метаболическая активность клеток проявляется в повышении содержания белка и РНК, активной выработке ферментов, а также в увеличении объема клеток [19]. Максимальной удельной скорости роста культура штамма *B. subtilis* BZR 336g достигала к 24 ч культивирования: $0,097$ ч⁻¹. При дальнейшем культивировании величина удельной скорости роста начинала уменьшаться и к 36 ч составила $0,005$ ч⁻¹. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 к 8 ч культивирования начиналась переходная фаза. Численность его в единице объема начинала увеличиваться и составила $(4,7 \pm 0,09) \times 10^8$ КОЕ/мл. Максимальная удельная скорость роста зафиксирована при 24 ч: $0,04$ ч⁻¹.

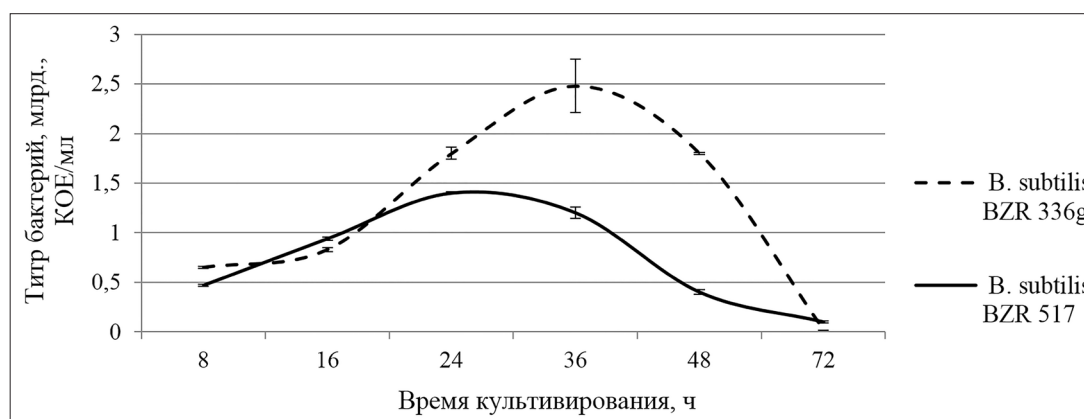


Рис. 1. Количество колониеобразующих единиц штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в условиях периодического культивирования

После короткой стационарной фазы, во время которой происходило прекращение роста бациллярных клеток, наступала фаза отмирания (после 36 ч культивирования для штамма *B. subtilis* BZR 336g и после 24 ч для штамма *B. subtilis* BZR 517).

Максимальный титр клеток ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечен в диапазоне 24–48 ч и составил $1,8–2,4 \times 10^9$ КОЕ/мл, для ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 – 24–36 ч: $1,2–1,4 \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно.

Анализ динамики роста исследуемых бактерий позволяет сделать вывод о том, что при культивировании в диапазоне 24–48 ч компоненты питательной среды активно потреблялись или практически полностью утилизируются бациллярными штаммами, а продукты

обмена, в том числе и антифунгальные вещества, накапливались.

При этом в процессе исследования антифунгальной активности в зависимости от времени культивирования установлено, что максимальная активность в отношении тест-культуры гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 у штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечена в диапазоне культивирования от 16 до 72 ч, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – от 16 до 36 ч (рис. 2, 3).

Кроме того, к пятым суткам инкубирования в указанных вариантах наблюдались зоны лизированного мицелия и отсутствие роста патогена на посевном блоке, что указывает на усиление антифунгальной активности исследуемых штаммов при увеличении времени культивирования.

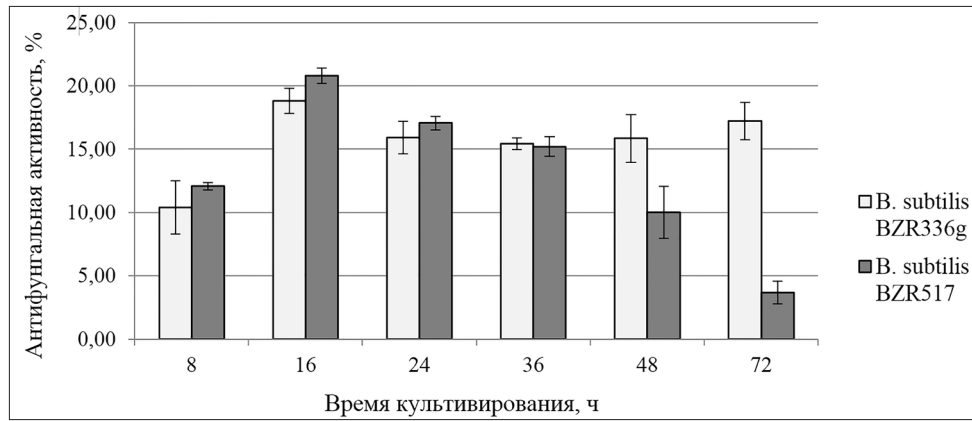


Рис. 2. Антифунгальная активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 в условиях периодического культивирования

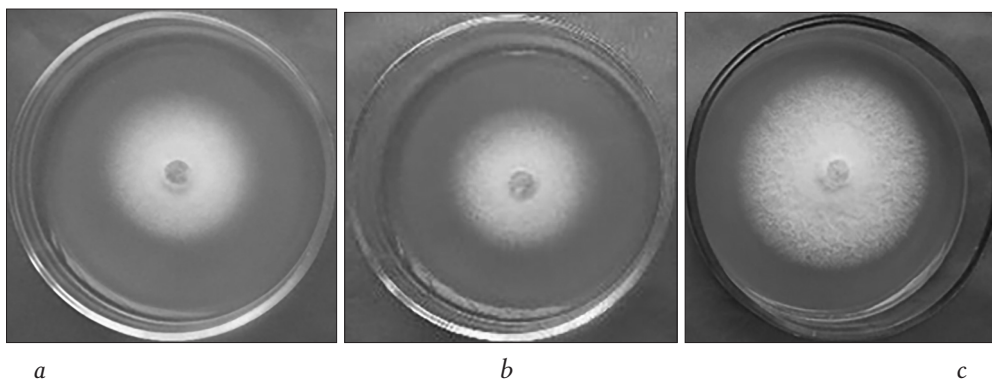


Рис. 3. Мицелий *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6. а – вариант с добавлением ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g; (48 ч культивирования); б – вариант с добавлением ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 517; (36 ч культивирования); с – контроль без добавления ЖК бактерий

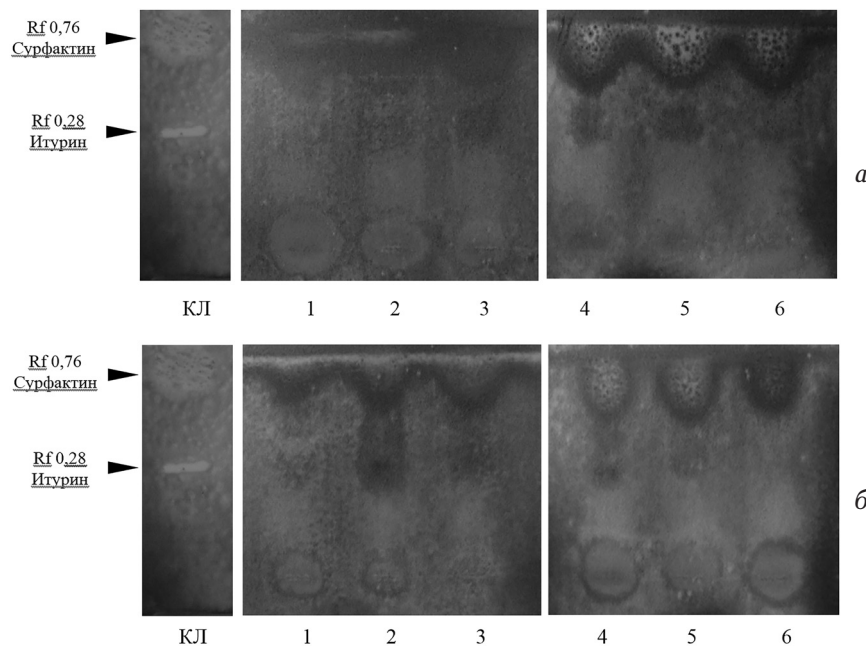


Рис. 4. Биоавтограммы коммерческих липопептидов (КЛ) и ЖК на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от времени периодического культивирования (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6). 1 – 8 ч; 2 – 16 ч; 3 – 24 ч; 4 – 36 ч; 5 – 48 ч; 6 – 72 ч; а – штамм *B. subtilis* BZR 336g; б – штамм *B. subtilis* BZR 517

Обнаружено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g к 72 ч инкубации наблюдалось накопление метаболитов, оказывающих антифунгальный эффект (17,23%), в то время как для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечено снижение антифунгальной активности к этому времени (3,67%).

Необходимо отметить, что синтез антифунгальных метаболитов в вариантах опыта обоих штаммов, которые обеспечивают существенное ингибирование патогена, начинается раньше и заканчивается позже, чем зафиксирован максимальный титр бактерий.

С помощью метода биоавтографии с применением тест-гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 были выявлены группы соединений, оказывающих на патоген фунгицидный или фунгистатический эффект, предположительно относящиеся к группе сурфактинов и итуринов (рис. 4).

Обнаружено, что накопление антибиотических веществ начиналось через 8 ч культивирования. Максимальный синтез сурфактина зафиксирован при культивировании от 36 до 48 ч для штамма *B. subtilis* BZR 336g и от 24 до 48 ч — для штамма *B. subtilis* BZR 517. Накопление в ЖК итуринов начиналось с 24 ч и продолжалось до 48 ч для штамма *B. subtilis* BZR 336g, с 16 до 36 ч для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Заключение

В результате проведенных исследований изучена антифунгальная активность перспективных штаммов бактерий *B. subtilis* — продуцентов биопрепаратов. Определена максимальная удельная скорость роста: 0,097 ч⁻¹ (24 ч) для *B. subtilis* BZR 336g и 0,04 ч⁻¹ (24 ч) для *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что в условиях шейкеро-инкубаторов оптимальным временем культивирования по критерию количества КОЕ для штамма *B. subtilis* BZR 336g является 24–48 ч. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 оптимальным временем культивирования является 24–36 ч. Максимальная антифунгальная активность, определенная методом разведений, для штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечена в диапазоне от 16 до 72 ч, для штамма *B. subtilis* BZR 517 — от 16 до 36 ч. С помощью метода биоавтографии с применением в качестве эталона коммерческих липопептидов обнаружено, что активный синтез сурфактина и итурина происходит от 24 до 48 ч для штамма *B. subtilis* BZR 336g и от 16 до 48 ч — для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Для эффективного биофунгицида важно сочетание оптимального количества КОЕ с высокой антифунгальной активностью. Исходя из полученных данных, оптимальным временем культивирования в условиях шейкеро-

инкубаторов являются 36–48 ч для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 24–36 ч для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Полученные в настоящем исследовании результаты подтверждают перспективность использования новых штаммов бактерий рода *Bacillus* в сельскохозяйственной практике в качестве основы биопрепаратов фунгицидного действия. Полученные данные могут быть использованы для получения биофунгицидов как в условиях биологических лабораторий, так и в условиях промышленного производства.

Исследования выполнены согласно Государственному заданию № 075-00376-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № 0686-2019-0013.

Литература

1. Гордонова И.К., Никитина Э.К. Рост микромицетов и бактерий на различных целлюлозных субстратах // Colloquium-journal. — 2019. — № 8(32). — С. 12–15.
2. Гришечкина С.Д., Ермолова В.П. Эффективность Бацикола на основе нового штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* № 25 против вредителей-фитофагов и фитопатогенов // Сельскохозяйственная биология. — 2015. — № 3. — С. 98–105.
3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. — 528 с.
4. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов в препаративной форме «Смачивающийся порошок» на основе бактерий-антагонистов из рода *Pseudomonas* при поверхностном культивировании на жидкой питательной среде // Масличные культуры. — 2017. — № 3(171). — С. 93–96.
5. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств. — М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1982. — 264 с.
6. Понаморева О.Н., Иванова А.А., Ветрова А.А. Влияние температуры на физиологическую активность бактерий *Pseudomonas putida* BS3701 при росте в среде с салицилатом // Известия ТулГУ. Естественные науки. — 2016. — № 2–3. — С. 88–93.
7. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. — М.: Изд. Центр «Академия», 2005. — 608 с.
8. Самойлов Ю.К., Самойлов А.Ю. Модернизация производства биопрепаратов — требование времени // Защита и карантин растений. — 2013. — № 11. — С. 26.
9. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И., Томашевич Н.С. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии //

- Сельскохозяйственная биология. — 2019. — Т. 54. — № 1. — С. 178–185.
10. Asaturova A.M., Homyak A.I., Tomashevich N.S., Pavlova M.D., Zhevnova N.A., Dubyaga V.M., Kozitsin A.Ye., Sidorova T.M., Nadykta V.D., Ismailov V.Ya. Conditions for the cultivation of new *Bacillus* bacteria being micro bioproduct producers // Journal of Pure and Applied Microbiology. — 2015. — Vol. 9. — No. 4. — P. 2797–2804.
 11. Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // Frontiers in Plant Science. — 2018. — Vol. 9. — Article 1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
 12. Dhakal R., Singh D.N. Biopesticides: A key to sustainable agriculture // International Journal of Pure and Applied Bioscience. — 2019. — № 7(3). — P. 391–396.
 13. Dobrić S., Bååth E. Temperature affects lag period and growth of bacteria in soil according to a Ratkowsky (square root) model after a drying/rewetting episode // Soil Biology and Biochemistry. — 2018. — Vol. 124. — P. 32–37.
 14. Huang L. Simulation and evaluation of different statistical functions for describing lag time distributions of a bacterial growth curve // Microbial Risk Analysis. — 2016. — Vol. 1(2). — P. 47–55.
 15. Lengai G., Muthomi J. Biopesticides and their role in sustainable agricultural production // Journal of Biosciences and Medicines. — 2018. — Vol. 6. — P. 7–41.
 16. Liu X., Cao A., Yan D., Ouyang C., Wang Q., Li Y. Overview of mechanisms and uses of biopesticides // International Journal of Pest Management. — 2019. — P. 1–8.
 17. Montealegre J.R., Reyes R., Perez L.M. Selection of antagonists to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato // Electronic Journal of Biotechnology. — 2003. — Vol. 6. — No. 2. — P. 116–127.
 18. Muller A., Schade, C., El-Hage Scialabba N., Brüggemann J., Isensee A., Erb K.-H., Smith P., Klocke P., Leiber F., Stolze M., Niggli U. Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture // Nature Communications. — 2017. — Vol. 8. — P. 1290. doi: 10.1038/s41467-017-01410-w.
 19. Sadouk-Hachaïchi Z., Tazerouti A., Hacene H. Growth kinetics study of a bacterial consortium producing biosurfactants, constructed with six strains isolated from an oily sludge // Advances in Bioscience and Biotechnology. — 2014. — Vol. 5. — P. 418–425.
 20. Scheidt W., dos Santos Pedroza I.C.P., Fontana J., da Cruz Meleiro L.A., de Barros Soares L.H., Reis V.M. Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM) // Plant Soil. — 2019. — Vol. 451. — P. 1–13..
 21. Tumbariski Y., Petkov E., Denkova Z. Study on the influence of the cultural conditions and the composition of the culture medium on the antimicrobial activity of *Bacillus methylotrophicus* BM47 against some fungal phytopathogens // Journal of Global Biosciences. — 2015. — Vol. 4(8). — P. 2990–2996.
 22. Vargas S., Millán-Chiu B.E., Arvizu-Medrano S.M., Loske A.M., Rodríguez R. Dynamic light scattering: A fast and reliable method to analyze bacterial growth during the lag phase // Journal of Microbiological Methods. — 2017. — Vol. 137. — P. 34–39.
 23. Wang Y., Buchanan R.L. Develop mechanistic models of transition periods between lag/exponential and exponential/stationary phase // Procedia Food Science. — 2016. — Vol. 7. — P. 163–167.
 24. Yi Y.J., Li Y.S., Xia B., Li W.P., Pang L., Tong Z.D. Optimization of medium composition and culture conditions for antifungal activity of a tomato endophytic bacterium // Biological Control. — 2015. — Vol. 82. — P. 69–75.

THE RESEARCH OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS IN THE PERIODIC CULTIVATION PROCESS

A.I. HOMYAK, A.M. ASATUROVA, T.M. SIDOROVA, N.A. ZHEVNOVA

All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar

The antifungal activity of the strains of *Bacillus subtilis* BZR 336g and *Bacillus subtilis* BZR 517 against phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium* (by the example of *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6) depending on the cultivation time under incubator shaker conditions was studied. The maximum specific growth rate was established: 0.097 h⁻¹ (24 h) for *B. subtilis* BZR 336g and 0.04 h⁻¹ (24 h) for *B. subtilis* BZR 517. As a result of the studies, it was found the optimal cultivation period under the conditions of cultivation in shaker-incubators upon the criteria of antifungal activity and the number of cells was noted during cultivation from 36 to 48 h for *B. subtilis* BZR 336g strain, from 24 to 36 h for *B. subtilis* BZR 517 strain. The data obtained can be used to develop a technology of the biopreparation production based on the studied strains for crops protection from economically significant fungal diseases.

Keywords: *Bacillus subtilis*, periodic cultivation, antifungal activity, bioautography.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* И ВЫХОД ФИКОЦИАНИНА

Д.В. СУХИНОВ*, Я.Э. СЕРГЕЕВА

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Фикоцианин — натуральный пигмент ярко-синего цвета, синтезируемый цианобактериями. Фикоцианин используется в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, что определяет ежегодный рост мирового рынка этого пигмента, что, в свою очередь, вызвало резкий рост числа исследований, направленных на увеличение скорости роста цианобактерий и содержания фикоцианина в клетках, а также на повышение эффективности выделения и чистоты пигмента. В данной работе исследовали влияние температуры культивирования на рост и накопление биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619, а также содержание фикоцианина. Согласно полученным результатам, максимальный выход фикоцианина составил 350 мг/л питательной среды при температуре культивирования 30 °С и при сборе биомассы в середине фазы линейного роста культуры, который в исследуемых условиях приходился на 7–8-е сутки культивирования.

Ключевые слова: *Arthrospira platensis*, фикоцианин, температура культивирования.

Введение

Биомасса фототрофных микроорганизмов (микроводорослей и цианобактерий) является привлекательным сырьем для производства ценных биопродуктов, которые уникальны для данных организмов, содержатся в относительно высоком количестве и имеют высокую рыночную стоимость.

К одному из экономически значимых родов цианобактерий, характеризующихся высоким содержанием белка, β -каротина, витаминов (особенно В12), фикоцианина и γ -линоленовой кислоты [6, 18], относятся цианобактерии р. *Arthrospira*. В настоящее время *Arthrospira* (коммерческий синоним «Спирулина») представляет собой один из наиболее широко распространенных и культивируемых видов цианобактерий и микроводорослей. Согласно отчету [17], объем мирового рынка спирулины в 2018 году составил 348 млн долларов США и, по прогнозам, к 2026 году он достигнет 779 млн долларов США.

Важнейший продукт на современном рынке, получаемый из *Arthrospira*, — это фикоцианин (ФЦ), пигмент-белковый комплекс, фикобилипротеин ярко-синего

цвета. По расчетам [16], к концу 2028 года мировой рынок фикоцианина достигнет рыночной оценки порядка 219 млн. долларов США, при росте в среднем на 7,6% в течение прогнозируемого периода 2018–2028 гг.

В общем случае мировой рынок фикоцианина, в зависимости от области применения конечного продукта, условно можно поделить на три основных сегмента: пищевой, косметический и фармацевтический.

К числу существенных факторов, влияющих на мировой рынок фикоцианина, принадлежит растущий спрос на природные красители, особенно в регионе Западной Европы, вызванный полным запретом на искусственные красители. Кроме того, одобрение агентством Министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA, Food and Drug Administration) использования спирулины открывает возможность использования фикоцианина в качестве пищевого красителя кисломолочных продуктов, мороженого, безалкогольных и алкогольных напитков, жевательной резинки, десертов, сладких украшений для тортов, молочных коктейлей и т.д.

Кроме того, в результате многочисленных исследований установлено, что фикоцианин обладает антиоксидантной, противовоспалительной, гепатозащитной, иммуностимулирующей активностями [9, 14, 15]. Особый интерес представляют работы по изучению влияния фикоцианина на подавление пролиферации раковых клеток. Было доказано, что фикоцианин токсичен для раковых клеток, но нетоксичен для нормальных клеток организма. Исследования влияния фикоцианина на примере различных линий раковых клеток (печени, толстой

© 2020 г. Сухинов Д.В., Сергеева Я.Э.

* Автор для переписки:

Сухинов Даниил Владиславович
магистрант НИЦ «Курчатовский институт», отдел биотехнологии
и биоэнергетики
E-mail: suhinov.dv@phystech.edu

кишки, легких, молочной железы) продемонстрировали, что он может стать перспективным препаратом для борьбы с различными видами раковых опухолей [11].

К тому же в промышленности и лабораториях фикоцианин применяют в качестве флуоресцентного красителя. Также он нашел применение в проточной цитометрии, флуоресцентном иммуноанализе, флуоресцентной микроскопии [15]. Показана возможность использования и в качестве флуоресцентного зонда для наблюдения за ростом цианобактерий [12].

Таким образом, увеличение числа областей применения фикоцианина стимулирует рост мирового рынка. Одним из возможных решений, наряду с увеличением промышленных мощностей, представляется повышение продуктивности цианобактерий различными способами, в том числе и изменением параметров условий культивирования.

При выращивании фототрофных микроорганизмов, в том числе и цианобактерий, как в промышленных масштабах, так и лабораторных условиях при создании оптимальных условий культивирования следует принимать во внимание тот факт, что температура, наряду со светом, служит одним из основных факторов окружающей среды, поскольку она влияет на скорость и пути метаболизма, а, следовательно, и на биохимический состав клеток, доступность и потребление питательных веществ, а также другие физические свойства водной среды клеток [10].

Анализ данных литературы по росту цианобактерии в различных температурных режимах показал, что *A. platensis* жизнеспособна в широком диапазоне температур: от 20 до 40 °С с различными скоростями роста [4]. Температура ниже 20 °С и выше 40 °С значительно замедляет рост, а при 45 °С наблюдали полное отсутствие роста с исчезновением пигментации [13].

В большинстве случаев оптимальная температура для лабораторного культивирования цианобактерии р. *Arthrospira* находится в диапазоне 30–38 °С [2, 7, 13]. Тем не менее, необходимо отметить, что этот диапазон оптимальных для роста температур и устойчивость к экстремальным значениям могут варьировать в зависимости как от индивидуальных особенностей штамма, так и от состава питательной среды, используемой при культивировании.

Продуктивность фототрофных микроорганизмов, в том числе и цианобактерий, напрямую связана со скоростью фиксации CO₂/выделения O₂ и скоростью дыхания. Показано, что дыхательная активность *Arthrospira* имеет более высокий температурный оптимум,

чем фотосинтетическая активность [2]. Многие другие факторы, например, растворимость газов в среде, наличие питательных веществ, также напрямую зависят от температуры и, вероятно, влияют на рост и продуктивность культуры. Исследования, направленные на выявление этих взаимодействий, активно проводятся.

Цель настоящей работы — оптимизация условий культивирования цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619, оценка влияния температуры на рост и выход фикоцианина (мг/литр питательной среды).

Материалы и методы

Объект исследования: в качестве объекта исследования была выбрана цианобактерия *Arthrospira platensis* В-12619 (ВКПМ).

Культивирование проводилось в шейкере термостате Eppendorf New Brunswick Innova 42/42R при постоянном перемешивании (140 об./мин) и круглосуточном освещении 80 мкмоль/(м²·с) в трех температурных режимах 25, 30 и 35 °С. Колбы Эрленмейера рабочим объемом 1 л с 300 мл модифицированной среды Заррука [5, 8] засеивали 4-суточной суспензией *A. platensis*, начальное значение OD₇₅₀ — 0,050±0,005.

Контроль роста: контроль активности ростовых процессов осуществляли путем определения оптической плотности культуры при 750 нм (спектрофотометре ThermoScientific Genesys 10S UV-Vis, США); также контролировали величину рН (рН-метр Mettler Toledo S220-Kit, США).

Определение максимальной продуктивности биомассы (г/(л·сут)) проводили согласно [2].

Сбор проб: биомассу отделяли центрифугированием (7500 об./мин, 5 мин), дважды промывали дистиллированной водой.

Условия выделения фикоцианина: исчерпывающую экстракцию фикоцианина из предварительно обработанной (трехкратный цикл замораживания/оттаивания) влажной биомассы проводили при 4 °С, в качестве экстрагента использовали натрий-фосфатный буфер (рН 7,0). Осаждение биомассы проводили центрифугированием (10500 об./мин, 15 мин) [1].

Количественное определение фикоцианина. Содержание ФЦ определяли спектрофотометрически. Содержание рассчитывали по формулам [3]:

$$C\text{-PC}\left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}}\right) = \frac{A_{620} - 0,474 \times A_{650}}{5,34}$$

$$C_{\text{PC}} \left(\frac{\text{мг}}{\text{г}} \right) = \frac{C_{\text{PC}} \left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) \times V_{\text{р-ра}}}{m_{\text{навески}} (\text{г})}$$

где A_{λ} — оптическая плотность при λ нм.

Результаты и обсуждение

Влияние температуры культивирования на рост цианобактерии A. platensis

Культивирование *A. platensis* проводили в течение 15–17 суток. На рисунке 1 представлены кривые роста цианобактерии *A. platensis* при различных температурах культивирования.

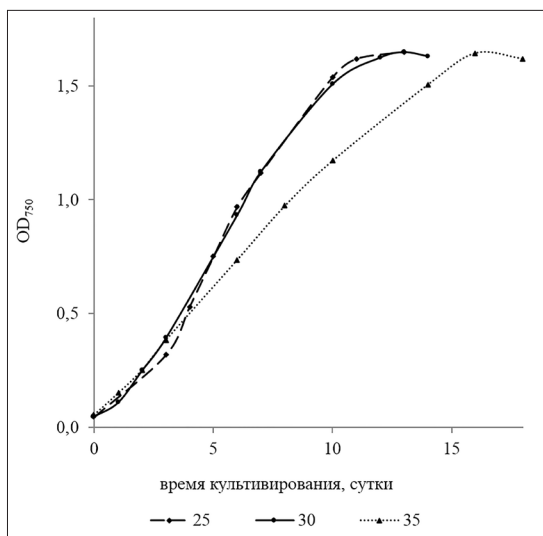


Рис. 1. Кривые роста цианобактерии *A. platensis* при разных температурах культивирования

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста, характеризующаяся постоянной удельной скоростью роста, независимо от температуры культивирования, отмечена на протяжении первых трех суток. Фаза линейного роста, для которой характерна постоянная абсолютная скорость роста, что соответствует линейному участку (наклонная прямая) на кривой, в случае культивирования при 25 и 30 °C продолжалась до 8 суток; при этом максимальная продуктивность составила 0,41 и 0,42 г/(л·сут) соответственно. При температуре культивирования 35 °C эта стадия была более продолжительной и максимальная продуктивность составила 0,31 г/(л·сут). Далее следует фаза замедления роста (абсолютная скорость роста снижается), переходящая в стационарную фазу роста, когда культура достигает максимальной плотности. Во всех опытных вариантах контролируемый параметр OD₇₅₀ не превышал 1,7, однако для достижения данной величины требовался различный временной интервал.

Таким образом, анализ роста культур, выращенных при разных температурах, показал разные закономерности роста. В результате исследования роста цианобактерии в трех температурных режимах установлено, что максимальная скорость роста и концентрация биомассы наблюдались при 25 и 30 °C и именно этот температурный интервал является оптимальным для роста накопительной культуры цианобактерии *A. platensis*.

Влияние температуры культивирования на содержание фикоцианина в клетках цианобактерии A. platensis

На следующем этапе исследований было определено содержание фикоцианина в культуре цианобактерии, находящейся в различных фазах роста. Фаза I — конец логарифмической, переход к линейной фазе роста; фаза II — середина линейной фазы; III — фаза замедления роста, переход к стационарной фазе.

Как видно из результатов, приведенных на рисунке 2, аналогичные закономерности накопления фикоцианина в клетках были отмечены при 25 и 30 °C — температурах, благоприятных для роста, а именно: увеличение содержания фикоцианина в линейной фазе роста (фаза II) и снижение его содержания при переходе в стационар (фаза III); при этом максимальное его содержание отмечено при 30 °C. При температуре культивирования 35 °C наибольшее содержание фикоцианина отмечено в период фазы I, далее оно снижалось и было на уровне 90 мг/г для фаз II и III.

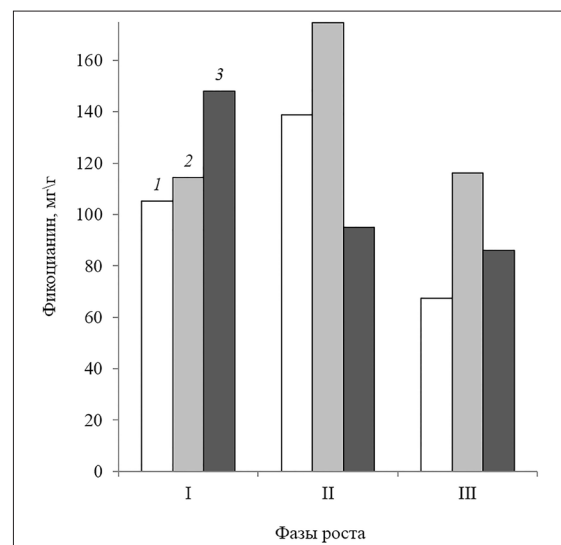


Рис. 2. Содержание (мг/г) фикоцианина в клетках цианобактерии *A. platensis* на различных стадиях развития. Культивирование проводилось при: 1 — 25 °C, 2 — 30 °C, 3 — 35 °C

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [13] о максимальном содержании фикоцианина при оптимальной для роста температуре культивирования.

*Влияние температуры культивирования цианобактерии *A. platensis* на выход фикоцианина*

На основании экспериментальных данных о содержании фикоцианина и выходе биомассы с литра среды был рассчитан выход фикоцианина (мг/л) для фазы II (максимальное содержание (мг/г) фикоцианина) и фазы III (максимальный выход (г/л) биомассы). Полученные показатели, представленные на рисунке 3, свидетельствуют о том, что при культивировании цианобактерии при 35 °С в течение 8–14 суток с 1 литра питательной среды можно получить не более 200 мг фикоцианина. Максимальный выход фикоцианина при температуре культивирования 25 °С был достигнут на 7–8-е сутки культивирования и составил порядка 270 мг/л. Максимальный выход фикоцианина в условиях различных температурных режимов составил 350 мг/л на 7–8-е сутки культивирования при 30 °С.

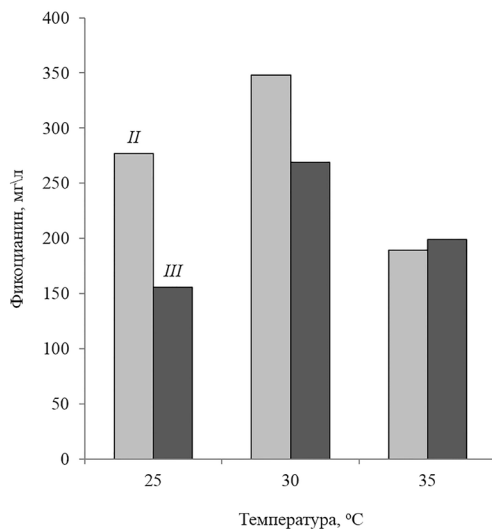


Рис. 3. Влияние температуры культивирования цианобактерии *A. platensis* на выход (мг/л) фикоцианина в фазе роста II и III

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что максимальное количество фикоцианина 350 мг/л питательной среды можно получить при культивировании цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619 на модифицированной среде Зарукка в течение 7–8 суток при постоянном перемешивании (140

об./мин), круглосуточном освещении 80 мкмоль/(м²·с) и температуре 30 °С.

Литература

1. Труфанова А.С., Бабиченко Н.П., Сергеева Я.Э. Оптимизация процесса выделения фикоцианина из цианобактерии *Arthrospira platensis* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2019. – Т. 15(4). – С.11–16.
2. Уильямсон М. Анализ биологических популяций. – М.: Мир, 1975. – 271 с.
3. Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga // Journal of Cell Biology. – 1973. – Vol. 58(2). – P. 419–435.
4. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. Micro-algal biotechnology. – Cambridge University Press, 1988. – 477 p.
5. Cogne G., Lehmann B., Dussap C., Gros J. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: Culture medium optimization // Biotechnology and Bioengineering. – 2003. – Vol. 81(5). – P. 588–593.
6. Cohen Z. The Chemicals of Spirulina. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. Vonshak A. (ed.). – London: Taylor & Francis Ltd., 1997. – 233 p. – P. 193–222.
7. Colla L.M., Oliveira Reinehr C., Reichert C., Costa J.A.V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes // Bioresource Technology. – 2007. – Vol. 98(7). – P. 1489–1493.
8. Cornet J.F., Dussap C.G., Cluzel P., Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations // Biotechnology and Bioengineering. – 1992. – Vol. 40(7). – P. 826–834.
9. Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin // Journal of Functional Foods. – 2014. – Vol. 11. – P. 375–392.
10. Furmaniak M.A., Misztak A.E., Franczuk M.D., Wilmotte A., Waleron M., Waleron K.F. Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – Article ID: 2541. doi: 10.3389/fmicb.2017.02541.
11. Jiang L., Wang Y., Yin Q., Liu G., Liu H., Huang Y., Li B. Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment // Journal of Cancer. – 2017. – Vol. 8(17). – P. 3416–3429.
12. Kong Y., Lou I., Zhang Y., Lou C.U., Mok K.M. Using an online phycocyanin fluorescence probe for rapid monitoring of

- cyanobacteria in Macau freshwater reservoir // *Hydrobiologia*. – 2014. – Vol. 741(1). – P. 33–49.
13. Kumar M., Kulshreshtha J., Singh G.P. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2011. – Vol. 42(3). – P. 1128–1135.
 14. Liu Q., Huang Y., Zhang R., Cai T., Cai Y. Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycoerythrin // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 2016. – Article ID: 7803846. doi:10.1155/2016/7803846.
 15. Li W., Su H., Pu Y., Chen J., Liu L., Liu Q., Qin S. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects // *Biotechnology Advances*. – 2019. – Vol. 37(2). – P. 340–353.
 16. Phycocyanin Market: Food & Beverage Application to Hold Close to 85% Value Share Throughout the Forecast Period: Global Industry Analysis (2013–2017) & Opportunity Assessment (2018–2028). URL: <https://www.reportlinker.com/ρ05503677/Phycocyanin-Market-Food-Beverage-Application-to-Hold-Close-to-85-Value-Share-Throughout-the-Forecast-Period-Global-Industry-Analysis-Opportunity-Assessment.html>.
 17. Spirulina Market Size and Share / Industry Forecast by 2019–2026. URL: <https://www.alliedmarketresearch.com/spirulina-market>.
 18. Wu Q., Liu L., Miron A., Klímová B., Wan D., Kuča K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview // *Archives of Toxicology*. – 2016. – Vol. 90(8). – P. 1817–1840.

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE GROWTH OF CYANOBACTERIUM *ARTHROSPIRA PLATENSIS* AND THE YIELD OF PHYCOCYANIN

D.V. SUKHINOV, Ya.E. SERGEEVA

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

Phycocyanin — natural pigment of bright blue color, synthesized by cyanobacteria. Phycocyanin is used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries, which determines the annual growth of the world market for this pigment, which in turn caused a sharp increase in the number of studies aimed at increasing the growth rate of cyanobacteria and the content of phycocyanin in the cells, as well as increasing the efficiency of isolation and pigment purity. In this work, it was studied effect of cultivation temperature on the growth and biomass accumulation of cyanobacterium *Arthrospira platensis* B-12619, as well as the content of phycocyanin. According to results, the maximum yield of phycocyanin was 350 mg/l medium at cultivation temperature of 30 °C and biomass harvesting in the middle of linear growth, which occurred on the 7–8th day of cultivation under the studied conditions.

Keywords: *Arthrospira platensis*, cultivation, temperature, phycocyanin.

ПАРАМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ИССЛЕДОВАННЫХ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

П.С. ЕРОХИН*, Н.А. ОСИНА, Д.В. УТКИН, С.П. ЗАДНОВА, А.Н. СПИЦЫН,
О.С. КУЗНЕЦОВ, А.С. АБДРАШИТОВА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Адаптация микроорганизмов к изменениям условий внешней среды определяется формой их защиты от различного вида воздействий. Одним из способов регистрации изменений бактерий является атомно-силовая микроскопия, которая позволяет определять ряд параметров клетки. Проведена параметрическая оценка состояния бактериальных клеток в различных условиях существования. Разработан комплекс количественных параметров для оценки морфофункциональных свойств клеток микроорганизмов I–IV патогенности, исследованных методом атомно-силовой микроскопии.

Ключевые слова: микроорганизмы, атомно-силовая микроскопия, индекс I, шероховатость, сила адгезии, параметры.

Введение

В микробиологии световая микроскопия является бесспорным лидером среди всех методов визуализации в силу доступности, относительной простоты приготовления исследуемых образцов, а также возможности изучения биологических структур в условиях, близких к природным. Слабой стороной оптических приборов является ограниченная дифракционным пределом разрешающая способность. Именно поэтому ультраструктуру микроорганизмов удалось изучить и описать лишь с появлением электронной микроскопии в 1940-е годы. Однако электронная микроскопия, до настоящего времени являющаяся единственным методом визуализации нанометрового разрешения, имеет ряд недостатков, главные из которых — сложность приготовления препаратов и необходимость проведения исследований в условиях высокого вакуума.

В настоящее время атомно-силовая микроскопия (АСМ) наиболее активно используется для изучения биологических образцов микронного и субмикронного уровня организации благодаря простой процедуре про-

боподготовки и возможности визуализации объектов практически в любой биологической среде.

Существование бактерий во многом зависит от влияния различных условий среды обитания. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды реализуются адаптационные свойства микроба, которые могут проявляться в обратимых или необратимых изменениях поверхностных структур клетки [11, 13]. Они могут быть зарегистрированы с использованием ряда различных методов микроскопии, в том числе атомно-силовой микроскопии [2]. АСМ позволяет оценить морфологические и механические параметры бактерий, изменяющиеся под влиянием биотических и абиотических факторов.

Основные морфофункциональные параметры бактерий, оцениваемые количественно с помощью АСМ, — длина, ширина, высота, а также рассчитанный на этой основе объем бактерий. Для оценки рельефа поверхности применяется параметр шероховатости — среднеквадратичная шероховатость — отклонение точек профиля от его средней линии. В процессе изменения поверхности бактериальной клетки наблюдаются изменения ригидности клеток (твердости) [1, 6] и силы адгезии [8, 10].

На модели *Bacillus subtilis* [14] отмечалось снижение высоты бактерий в 1,5 раза с 440 до 300 нм, увеличение среднеквадратичной шероховатости с $9,9 \pm 0,9$ до $15,6 \pm 4,0$ нм при воздействии трихохонина VI в минимальной ингибирующей концентрации на бактериальную клетку, что связано с принципом действия препарата.

© 2020 г. Ерохин П.С., Осина Н.А., Уткин Д.В., Заднова С.П., Спицын А.Н., Кузнецов О.С., Абдрашитова А.С.

* Автор для переписки:

Ерохин Павел Сергеевич
научный сотрудник ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Показано [9], что разрушенные клетки обладали более высокими значениями шероховатости поверхности: $33,6 \pm 18$ нм для *B. subtilis* против $19,4 \pm 3,6$ нм для контрольных показателей (RMS – root mean square). Для *Escherichia coli* аналогичный показатель обладал тенденцией к увеличению с $28,1 \pm 4,8$ до $39,3 \pm 13,4$ нм.

Адгезивные свойства [9] оценивались с определением силы адгезии под воздействием ампициллина в минимальной ингибирующей концентрации. Показатели претерпевали следующие изменения: от $0,34 \pm 0,18$ до $1,29 \pm 0,67$ нм для *B. subtilis*. Для *E. coli* аналогичный показатель обладал тенденцией к увеличению с $0,06 \pm 0,03$ до $0,09 \pm 0,03$ нм.

В результате полученный объем экспериментальных данных о параметрической оценке состояния бактериальной клетки в различных условиях существования нуждается в разработке оценочного комплекса параметров, наиболее полно описывающих процесс изменения свойств микроба, а также форму защиты в ответ на внешнее воздействие.

Материалы и методы.

Модельные микроорганизмы *Vibrio cholerae* выращивали в LB бульоне в течение 24 ч при температуре 37°C с дополнительным добавлением раствора хлорида натрия в концентрации 3М и экспозицией 2 ч; *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* культивировали на твердой питательной среде в течение 24 ч при температуре 37°C с дополнительной обработкой антибиотиками в течение 60 мин.

Затем бактериальные взвеси для исследования методом АСМ готовили в соответствии с МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Исследование проводилось в сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). Применялись кремниевые кантилеверы NSG01 (NT-MDT, Россия), напыленные золотом, – для режима прерывистого контакта (резонансная частота 120 кГц, константа жесткости – 5,5 Н/м) и CSG10 (NT-MDT, Россия) – для режима непрерывного контакта (резонансная частота 20 кГц, константа жесткости – 0,1 Н/м). Исследования выполнялись в режимах прерывистого и непрерывного контакта АСМ.

Результаты и обсуждение

Ранее нами были проведены исследования с использованием методов атомно-силовой микроскопии по определению морфометрических свойств бактериальных клеток под различными воздействиями [3–5]. Для количественной оценки степени повреждения клеточной массы был предложен ряд оценочных параметров, включающий в себя индекс I (отношение ширины к высоте объекта исследований), шероховатость поверхности клеточной стенки, а также сила адгезии.

Несмотря на достигнутые успехи в данном направлении, индекс I является величиной, характеризующей изменение состояния линейных размеров бактерий только по двум направлениям. Увеличение данной характеристики сопровождается повышением ширины клетки по отношению к ее высоте или снижению значения высоты по отношению к показателям ширины и учитывает изменение клетки в двух направлениях.

Величина шероховатости RMS учитывает разброс высот на поверхности клеточной стенки от средних значений, не имея пространственной ориентации по остальным направлениям. Этот параметр оценки в наиболее полной мере характеризует степень укладки пептидогликана по объему клеточной стенки.

Сила адгезии, характеризующая способность микроба прикрепляться к поверхности, опосредованно определяет персистенность патогена в окружающей среде. Эта величина не является интегральной по поверхности бактерий, а характеризует локальные свойства объекта исследований в выбранной точке.

В связи с этим на первом этапе работы *in silico* нами была предложена модель, которая предусматривает введение дополнительных параметров, которые в наиболее полной мере будут учитывать изменения свойств клеток в различных условиях существования.

Регистрация изменений линейных размеров микроорганизмов (длина, ширина, высота) сопровождалась их значительными изменениями, а в отдельных случаях гетерогенность значений достигала 50%-ного отклонения от усредненных показателей.

В соответствии с этим был сделан вывод о второстепенной возможности их использования в качестве критерия для количественной оценки состояния бактериальных клеток в различных условиях существования и формы защиты в ответ на внешнее воздействие.

Поэтому в качестве дополнительных параметров могут быть рассмотрены производные от полученных характеристик – площадь поперечного сечения и объем

объекта исследований, коэффициент уширения (площадь/ширина), коэффициент вытянутости (длина/ширина), коэффициент уплощенности. Выбранные параметры оценки состояния бактериальных клеток

учитывают эффекты отклонения значений параметров микроба в трех направлениях — по направлению длины, ширины и высоты клетки (табл. 1), возникающие при адаптации возбудителя к новым условиям существования.

Таблица 1

Модельные изменения рассматриваемых параметров в зависимости от типа клеток в различных условиях существования

Величина	Форма клетки	Прогноз изменения рассматриваемых параметров в зависимости от типа клеток в различных условиях существования
Индекс I	Палочки	Рост за счет увеличения ширины и/или снижения высоты
	Коккобациллы	Снижение за счет снижения ширины или увеличения высоты
	Кокки	Рост за счет увеличения ширины и/или снижения высоты
Коэффициент уплощения	Палочки	Рост за счет снижения длины клеток по отношению к ширине
	Коккобациллы	Снижение за счет снижения длины клеток по отношению к ширине
	Кокки	Рост за счет снижения длины клеток
Коэффициент уширения	Палочки	Рост за счет снижения длины клеток по отношению к ширине
	Коккобациллы	Снижение за счет снижения длины клеток по отношению к ширине
	Кокки	Рост за счет снижения длины клеток
Коэффициент вытянутости	Палочки	Рост за счет снижения длины клеток по отношению к ширине
	Коккобациллы	Снижение за счет снижения длины клеток по отношению к ширине
	Кокки	Рост за счет снижения длины клеток

Для определения степени универсализма применения выбранных параметров для характеристики микробных клеток методом АСМ были проведены модельные эксперименты по оценке влияния некоторых воздействий на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы: антибактериальных препаратов на кокки и коккобациллы и осмотического давления на палочки (рис. 1, табл. 2).

Наиболее полно среди выбранных параметров адаптационную изменчивость микроорганизмов характеризовало изменение индекса I, которое имело тенденцию к снижению к минимальным значениям при максимальной жесткости клеток. В случае минимизации упругих свойств клеточной стенки бактерий наблюдали максимальный рост соотношения ширина/высота.

Для бактерий, имеющих форму палочек в условиях осмотического стресса, этот показатель имел тенденцию к увеличению в 1,1–1,28 раза, для коккобацилл под воздействием антибиотиков — снижение в 1,5–4,23 раза, для микробных клеток со сферической формой в условиях неблагоприятного воздействия антибактериальных пре-

паратов — увеличение в 1,15–1,25 раза. Вероятно, данная направленность связана с деструктивно-дегенеративными изменениями в клетке микроорганизма и укладке пептидогликана клеточной стенки бактерий, что провоцировало подобную изменчивость данных. Кроме того, для палочек и коккобацилл отмечалось снижение длины клеток, сопровождающееся стремлением клетки принять овоидную форму, в то время как у кокков наблюдалось увеличение аналогичных показателей.

На следующем этапе была проведена оценка изменений шероховатости поверхности клеточной стенки как критерия, характеризующего степень неоднородности и распределения пептидогликана у бактерий под воздействием антибактериальных препаратов и осмотического давления. В различных экспериментах установлены существенные количественные изменения этого показателя с увеличением абсолютной величины в 2,1–3,05 раза.

Например, влияние осмотического стресса на палочки сопровождалось выделением большого количества экзополисахарида, провоцирующего увеличение соответствующих значений RMS в 2,1 раза.

В то же время как для кокков, так и для коккобацилл аналогичным образом отмечали увеличение шероховатости клеточной стенки при исследовании воздействия антибактериальных препаратов пенициллинового ряда, что свидетельствует о высокой информационной способности выбранного показателя.

По мнению ряда авторов [12], одним из факторов вирулентности возбудителей опасных инфекционных болезней является адгезивная способность. Показано, что вирулентные штаммы обладают в 2–2,5 раза большей силой адгезии по сравнению с авирулентными, что при-

водит к минимальной вероятности их гибели во внешних условиях существования.

На этом основании нами оценивалась величина силы адгезии модельных микроорганизмов. Во всех случаях (осмотический стресс, влияние антибиотиков) наблюдали увеличение адгезионной способности бактерий к покровному стеклу, что может быть использовано в качестве дополнительного фундаментального диагностического критерия для оценки степени адаптационной способности возбудителей и деструктивной способности препарата.

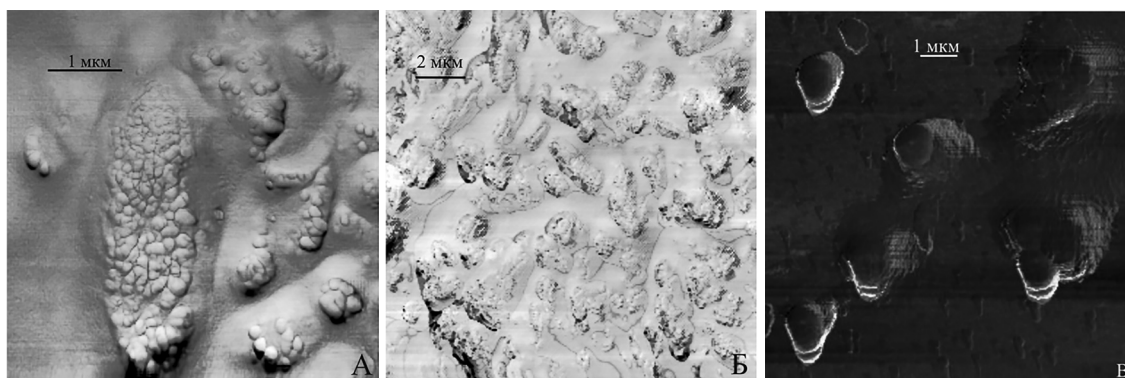


Рис. 1. АСМ изображения *V. cholerae* (А, Б) и *S. aureus* (В). Метод отображения фазы. Время экспозиции 3М NaCl: А – 40 мин; Б – 90 мин. Время экспозиции гентамицина: В – 60 мин

Таблица 2

Результаты изменения выбранных параметров для оценки морфометрических свойств бактериальной клетки под воздействием выбранных веществ

Величина	Форма клетки	Результаты изменения выбранных параметров под воздействием выбранных веществ
Индекс I	Палочки	Рост в 1,1–1,28 раза
	Коккобациллы	Снижение в 1,5–4,23 раза
	Кокки	Рост в 1,15–1,25 раза
Коэффициент уплощения	Палочки	Рост в 1,9 раза
	Коккобациллы	Снижение в 3,21 раза
	Кокки	Рост в 2,11 раза
Коэффициент уширения	Палочки	Рост в 1,48 раза
	Коккобациллы	Снижение в 1,12 раза
	Кокки	Рост в 1,63 раза
Коэффициент вытянутости	Палочки	Рост в 1,28 раза
	Коккобациллы	Снижение в 1,11 раза
	Кокки	Рост в 1,06 раза

Анализ изменчивости коэффициентов уширения ($K=1,12$) и коэффициента вытянутости ($K=1,11$) показал их наименьшее снижение на модели чувствительного к гентамицину штамма *K. pneumoniae* под воздействием соответствующего антибактериального средства в течение 60 мин.

В данных условиях эксперимента в действительности наблюдали сокращение длины микроба, стремящегося сократить площадь поглощения деструктирующего вещества, а, следовательно, и снижение риска более глубоких повреждений в структуре клетки.

Характерной особенностью осмотического воздействия на клетки в форме палочек являлся рост коэффициента уплощения вследствие увеличения длины клеток по отношению к ширине в 1,9 раза, которое сопровождается перераспределением как внутриклеточных компонентов клетки, так и структурных особенностей клеточной стенки. Полученные результаты для микроорганизмов кокковой формы при воздействии антибактериальных препаратов по направленности соответствовали данным, полученным для палочек, — рост в 2,11 раза.

Обратную динамику наблюдали для коккобацилл. Отмечали снижение коэффициента уплощения в 3,21 раза, коэффициента уширения — в 1,12 раза, коэффициента вытянутости — в 1,11 раза.

В результате исследований продемонстрировано, что изменение выбранных показателей у бактерий различной формы (палочки, кокки, коккобациллы) в полной мере укладывается в предложенную модель.

Заключение

Таким образом, разработан комплекс критериев для оценки состояния бактериальной клетки и ее поверхности, определяемых с помощью АСМ, наиболее полно описывающих процесс изменения свойств микроба.

Обнаружено, что к параметрам, наиболее полно описывающим реакцию клетки на внешний раздражитель, относятся индекс I, коэффициенты уширения, вытянутости и уплощения, шероховатость поверхности клеточной стенки, а также сила адгезии. При этом все критерии не зависят от формы бактерий и их тинкториальных свойств (окраска по Граму).

Кроме того, сформированная панель критериев оценки состояния микробных клеток учитывает форму изменчивости возбудителя при различных воздействиях.

В ходе работы установлены некоторые особенности формирования ответа микробных клеток в неблагоприятных условиях существования. В ходе проведения модельных экспериментов нами определена направленность и характер этих изменений.

Следует отметить, что полученные данные связаны с деструктивно-дегенеративными изменениями в клетке, что может быть использовано в дальнейших исследованиях в этом направлении. Однако для получения наиболее полной картины возникает необходимость решения дополнительных вопросов, связанных с расширением количества полученных данных, их стандартизации при изучении различных видов микроорганизмов (палочки, кокки, коккобациллы), понимания процессов изменчи-

вости микроорганизмов различной формы в различных условиях существования.

Также необходимым и в то же время не менее важным аспектом фундаментального применения является формирование базы данных эталонов сравнения.

Литература

1. *Вальшев А.В., Васильченко А.С.* Изучение особенностей действия катионного антимикробного пептида низина на бактерии *Listeria monocytogenes* с использованием атомно-силовой микроскопии // Журнал микробиологии. — 2013. — № 5. — С. 8–13.
2. *Васильченко А.С.* Исследование морфофункциональной реакции бактерий на различные воздействия с использованием атомно-силовой микроскопии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Пермь, 2012. — 22 с.
3. *Ерохин П.С., Коннов Н.П., Заднова С.П., Бугоркова Т.В.* Динамическая характеристика микроорганизмов в условиях неблагоприятного действия факторов абиотической природы методом сканирующей зондовой микроскопии // Вестник Саратовского государственного технического университета. — 2015. — № 4(81). — С. 23–28.
4. *Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И.* Влияние осмотического и оксидативного стресса на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2015. — № 6. — С. 55–62.
5. *Клюева С.Н., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кузнецова Е.М., Волох О.А.* Оценка стимулирующего влияния биогенного амина серотонина на капсулоподобное вещество *Francisella tularensis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2016. — № 4. — С. 9–16.
6. *Asgari M., Abi-Rafeh J., Hendy G.N., Pasinia D.* Material anisotropy and elasticity of cortical and trabecular bone in the adult mouse femur via AFM indentation // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. — 2019. — Vol. 93. — P. 81–92.
7. *Chao Y., Zhang T.* Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — Vol. 92(2). — P. 381–392.
8. *Diaz A.G., Quinteros D.A., Llabot J.M., Palma S.D., Allemandi D.A., Ghersi G., Zylberman V., Goldbaum F.A., Estein S.M.* Spray dried microspheres based on chitosan: A promising new carrier for intranasal administration of polymeric antigen BLSOmp31 for prevention of ovine brucellosis // Materials Science and Engineering: C. — 2016. — Vol. 62. — P. 489–496.
9. *Laskowski D., Strzelecki J., Pawlak K., Dahm H., Balter A.* Effect of ampicillin on adhesive properties of bacteria examined

- by atomic force microscopy // *Micron*. – 2018. – Vol. 112. – P. 84–90.
10. Li A.G., Burggraf L.W., Xing Y. Nanomechanical characterization of *Bacillus anthracis* spores by atomic force microscopy // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2016. – Vol. 82. – No. 10. – P. 2988–2999.
11. Nikiyan H., Vasilchenko A., Deryabin D. AFM investigations of various disturbing factors on bacterial cells / In: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. – 2010. – Vol. 1. – No. 4. – P. 523–529.
12. Park B.-J., Haines T., Abu-Lail N.I. A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2009. – Vol. 73(2). – P. 237–243.
13. Rhen M., Eriksson S., Pettersson S. Bacterial adaptation to host innate immunity responses // *Curr. Opin. in Microbiol.* – 2000. – Vol. 3(1). – P. 60–64.
14. Su H.-N., Chen Z.-H., Song X.-Y., Chen X.-L., Shi M., Zhou B.-C., Zhao X., Zhang Y.-Z. Antimicrobial peptide trichokonin VI-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis* // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7(9). – e45818. doi.org/10.1371/journal.pone.0045818.

PARAMETRIC ASSESSMENT OF BACTERIAL CELLS STUDIED USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY

P.S. EROKHIN, N.A. OSINA, D.V. UTKIN, S.P. ZADNOVA, A.N.SPITSYN,
O.S. KUZNETSOV, A.S. ABDRASHITOVA

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The adaptation of microorganisms to changes in environmental conditions is determined by the form of their protection to various types of influences. One way to record bacterial changes is atomic force microscopy, which allows to determine a number of cell parameters. A parametric assessment of the state of bacterial cells in various conditions of existence was carried out. A set of quantitative parameters has been developed to assess the morpho-functional properties of cells of microorganisms I–IV pathogenicity, studied by atomic force microscopy.

Keywords: microorganisms, atomic force microscopy, index I, roughness, adhesion force, parameters.

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЭДМОНДА ФИШЕРА – БИОХИМИКА, ОТКРЫВШЕГО ОБРАТИМОЕ БЕЛКОВОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

В.С. ВОРОБЬЕВ*

ФГБНУ «Психологический институт РАО», Москва

В связи со 100-летием со дня рождения швейцарско-американского биохимика Эдмонда Генри Фишера, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1992 года, подготовлена юбилейная статья с анализом его жизни и творчества.

Ключевые слова: история науки, биохимия, обратимое белковое фосфорилирование, Эдмонд Генри Фишер.



Введение. В апреле 2020 года исполнилось 100 лет со дня рождения Эдмонда Генри Фишера, швейцарско-американского биохимика, открывшего обратимое белковое фосфорилирование и удостоенного за это Нобелевской премии. Такого результата он достиг, работая совместно с Эдвином Кребсом в Вашингтонском университете Сиэтла (включая и эту премию). У него есть несколько однофамильцев, также награжденных Нобелевской премией. Юбилейная дата открывает возможность дать более подробное жизнеописание и анализ научного вклада ученого.

Краткая биография. У Э. Фишера сложное генеалогическое древо. Родился он 6 апреля 1920 г.

в Шанхае. Его мать Рене Таперну была уроженкой Франции, отец Оскар Фишер – австрийским евреем, который переехал в Шанхай из Вены после получения докторской степени по юриспруденции. В Китай переехал и дед по отцовской линии, где он основал газету на французском языке и французскую муниципальную школу, которую начал посещать маленький Эдмонд. В 7 лет его направили в пансион в Швейцарию. В 1935 году для завершения среднего образования он поступил в Коллеж де Женев, при этом параллельно учился в Женевской консерватории.

В 1939–1945 гг. Фишер проходил обучение в Женевском университете, изучая химию и биологию. В 1947 году он получил докторскую степень. Руководителем его диссертации был немецкий химик-органик Курт Генрих Мейер, покинувший Германию в 1932 г. по политическим мотивам и давший хорошие основы базовых знаний в данной отрасли. С 1947 по 1953 гг. Фишер состоял на должности приват-доцента. Его научные интересы сосредоточились на энзимологии (он занимался главным образом изучением амилазы).

В начале 1950-х годов Фишер переехал в США, в Вашингтонский университет (Сиэтл). В этом учреждении он проработал всю оставшуюся жизнь. В 1961 году он занял должность профессора, а с 1990 г. стал почетным профессором. Почти сразу он сблизился с Эдвином Кребсом, что привело их к целеустремленному совместному исследованию гликогенфосфоорилазы и дало впечатляющий результат, увенчанный высшими научными наградами [11].

Вклад в науку. Поначалу тема их работы носила характер частной биохимической проблемы. Однако последующие исследования показали, что активация-инактивация указанного фермента вызывалась его

© 2020 г. Воробьев В.С.

* Автор для переписки:

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления Общества биотехнологов

России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: vestnik@biosinfo.ru

обратимым фосфорилированием и имеет отношение к ключевым регуляторным процессам в клетке. Этот механизм катализируется двумя ферментами: протеинкиназой и фосфатазой. Протеинкиназа (наиболее распространенная — тирозинкиназа) переносит фосфатную группу с АТФ на гидроксильную группу фермента. В этом случае конформация фермента изменяется, и он становится каталитически активным. Далее белковая фосфатаза отщепляет фосфатную группу и фермент возвращается в изначальную неактивную форму. При этом оказалось, что циклическое регулирование ферментативной активности и соответствующих обменных событий имеет общебиологическое значение. Присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1992 году Эдмунду Фишеру и Эдвину Кребсу с формулировкой: «За открытие обратимого белкового фосфорилирования как механизма биологического регулирования» означало широкое признание данного факта научной общественностью. На рисунке 1 приведено фото Эдвина Кребса.

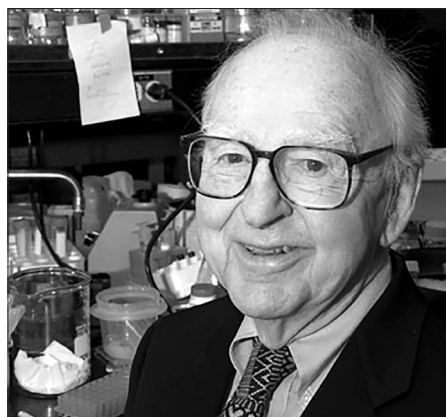


Рис. 1. Э. Кребс (1922–2009), со-получатель Нобелевской премии 1992 г.

Нужно кратко охарактеризовать и его соополучателя и доополучателя Нобелевской премии, Э. Кребса (1918–2009). Следует добавить, что и у Э. Кребса есть знаменитый однофамилец, первооткрыватель цикла Кребса — Х.А. Кребс, тоже лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1953) (ниже будет рассказано и об однофамильцах Э. Фишера).

По возрасту Эдвин Кребс был близок с Э. Фишером, объединяли их и германо-австрийские корни [1, 16]. У Э. Кребса также была интересная, сложная биография. Он был сыном преторианского священника. После II мировой войны и демобилизации из военно-морских сил США он стал работать у супругов Кори (Нобелевских лауреатов 1947 г. — трудился там 2 года), у которых, кстати, в

свое время работали Северо Очоа и Артур Корнберг, а Э. Фишер, как уже указывалось, учился в Швейцарии у известного немецкого химика Мейера. Так что ничего случайного не бывает: прикосновение желательное в молодые годы к авторитетной научной школе, и путь уже определен и предсказуем в положительном плане, в том числе и с выдающимися итогами. Сколько мы знаем таких примеров: достаточно упомянуть у нас хотя бы Кизеля и А.Н. Белозерского среди химиков, а как много случаев и в других областях. Везде реализуется ось «учитель-ученик» и выстраивается эстафета передачи знаний.

Таким образом, энзимологическая тема Э. Кребса и Э. Фишера, да и тематика по гликогеновому обмену, скорее всего, были прямым следствием влияния супругов Кори. Между прочим, Э. Фишер написал прекрасную биографию своего многолетнего соратника после его кончины 10 лет назад [7].

Награды и общественное признание. Э. Фишер был избран членом Лондонского королевского общества (2010). Он состоит членом Американской академии искусств и наук (с 1972 г.) и Национальной академии наук США (с 1973 г.). Он — почетный доктор Университета Монпелье (Франция), Базельского университета (Швейцария), Цзилиньского университета (Китай). Награжден медалью Вернера, присуждаемой Швейцарским химическим обществом (1952), премией Жюбера Женевского университета (1968) и др. Является почетным профессором Вашингтонского университета (Сиэтл). Удостоен мемориальной лекции Вейцмана (1993). Его долголетие способствует расширению сферы его общественного авторитета. Так, в 2007–2014 гг. он был почетным президентом Всемирного культурного совета.

Четыре Фишера — четыре Нобелевских лауреата. Есть в рассматриваемой теме один момент, который не безразличен в условиях деперсонализации фактических данных в наше время, когда в информационном пространстве практически сведено на нет употребление эпонимов в науке и практике, снижены до минимума качественные характеристики и исторический контекст того или иного феномена, постоянно говорится о цифровых эквивалентах, виртуальной реальности, зачастую игнорируется источник информации и т.д. Речь идет о наличии четырех Фишеров — четырех знаменитостей, лауреатов Нобелевской премии по химии (3) и по физиологии и медицине (1). Их портреты представлены на рисунке 2 с краткими аннотациями. Целесообразно дать и небольшой комментарий к этому.



Рис. 2. А — Эмиль Герман Фишер, Б — Ханс Эйген Фишер, В — Эрнст Отто Фишер, Г — Эдмонд Генри Фишер

Первый по времени и абсолютный по исторической значимости — Эмиль Герман Фишер (1852–1919) [2, 12]. Нобелевская премия по химии была получена им в 1902 году. Она была второй по счету после Вант-Гоффа и заняла место перед остальными тремя лидерами первоначальной пятёрки: Сванте Аррениусом, Уильямом Рамзаем и Адольфом фон Байером (это при живом-то Менделееве). Что касается реального вклада Эмиля Фишера в науку и практику, то он беспрецедентен и приближается к имени химиков уровня Либиха или Бухнера. Достаточно упомянуть такие его открытия, как: исследование строения пуриновых соединений, масштабные исследования углеводов и синтез виноградного и фруктового сахара, применение ферментов для синтеза химических соединений, исследования по химии белков, открытие аминокислот валина, пролина и оксипролина, синтез полипептидов и др. Ясно, что Фишер еще при жизни стал велик и недостижим, для своего времени он был только один и только Эмиль Герман.

Но время шло и в следующем поколении появился другой носитель той же фамилии — Ханс Эйген Фишер (1881–1945) [3, 13], лауреат Нобелевской премии по химии 1930 года, которая была получена им «за исследования по конструированию гемина и хлорофилла,

особенно за синтез гемина». Основные работы этого ученого касаются химии пиррола и его производных. Он осуществил синтез порфирина, гемина, билирубина, хлорофиллов а и в. Конечно, масштабы были уже не те, как у его однофамильца химика-первопроходца, соотечественника и, кстати, его учителя, но все равно для различения в исторической перспективе требуются внимательность и вписанность в контекст (особенно когда появились еще два Фишера и оба Нобелевских лауреата).

Третий Фишер — Эрнст Отто (1918–2007) [5, 14]. Нобелевскую премию по химии ему вручили в 1973 г. «за новаторские, независимо друг от друга проведенные работы по химии органометаллических сдвигевых соединений» (половинная премия совместно с Джеффри Уилкинсоном). Здесь речь идет о специальном разделе органической химии на стыке с неорганической, то есть самостоятельной области исследований, где легко можно дифференцировать авторский вклад. К тому же есть и существенный временной разрыв между «разными Фишерами».

Четвертый Фишер — Эдмонд Генри (род. в 1920 г.), которому посвящена настоящая статья, также принадлежит к более поздним поколениям исследователей и сферой его деятельности является биохимия. Выше говорилось о его научной работе и признании Нобелевским комитетом (Нобелевская премия по физиологии и медицине присуждена ему вместе с Э. Кребсом в 1992 году). Понятно, что временные пласты у всех Фишеров совершенно различные и требуется только внимательно следить за единством времени, места и действия каждой, отдельно взятой личности. Особенно это важно при использовании сокращений (включая сложные имена) и иных обезличивающих способов в информационных источниках.

Надо отметить, что первые трое причисляются к немцам однозначно, а четвертый имеет отца — австрийского (немецкоговорящего) подданного. К тому же англоязычное написание фамилии живущего в США Эдмонда Фишера также сохраняет германскую основу «Fischer». Поэтому все Фишеры должны хорошо идентифицироваться специалистами во избежание возможных неоднозначностей и ошибок.

Есть еще одно обстоятельство, на которое нельзя не указать в рассматриваемом контексте. Это — упомянуть о пятом Фишере, еще одном широко известном Фишере (кроме шахматиста и других относительно менее знаменитых имен — их энциклопедии приводят 12). Речь идет о Роналде Эйлмере Фишере (1890–1962) [17], английском статистике, биологе-эволюционисте, генетике, авторе популярной книги «Статистические

методы для исследователей» [18]. Применил методы математической статистики в популяционной генетике. Выполнил основополагающую работу по генетической теории естественного отбора. Так что по критерию получения Нобелевской премии он не входит в упомянутую четверку, но вполне заслуживает благодарной памяти творческих людей следующих поколений.

Информация. Биографические и научные данные об Эдмонде Генри Фишере хорошо представлены на нобелевском сайте, в том числе его подробная автобиография [8, 10, 15], и в научных изданиях, энциклопедиях, справочниках и Интернете [4, 6, 9, 11], так что соответствующие специалисты, имеющие опыт историко-научной реконструкции, смогут воссоздать по отдельным деталям образ ныне здравствующего 100-летнего ученого.

Литература

1. Кребс, Эдвин. — Википедия.
2. Фишер, Герман Эмиль. — Википедия.
3. Фишер, Ханс. — Википедия.
4. Фишер, Эдмонд. — Википедия.
5. Фишер, Эрнст Отто. — Википедия.
6. *Edmond H. Fischer* 1920 *Edwin G. Krebs* 1918. www.history.nih.gov/exhibits/rodbell/text/1_Fischer_Krebs.htm.
7. *Edwin G. Krebs* (1918–2009). A Biographical Memoir by *Edmond H. Fischer*. — National Academy of Sciences, Washington, DC, 2010.
8. *Fischer Edmond H.* Protein phosphorylation and cellular regulation, II. Nobel lecture. www.nobelprize.org/prizes/medicine/1992/fischer/lecture. См. также: www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fischer-lecture-1.pdf.
9. *Fischer E.H., Krebs E.G.* Relationship of Structure to Function of Muscle Phosphorylase // *Fed. Proc.* — 1966. — Vol. 25(5). — P. 1511–1520.
10. MLA style: *Edmond H. Fischer* — Biographical Nobel Prize, Nobel Media AB 2020 Sun 22 Mar 2020.
11. www.depts.washington.edu/phcol/nobelprize/index.php,
12. www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1902/fischer/biographical.
13. www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1930/fischer/biographical.
14. www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1973/fischer/biographical.
15. www.nobelprize.org/prizes/medicine/1992/fischer/biographical.
16. www.nobelprize.org/prizes/medicine/1992/krebs/biographical.
17. Фишер, Роналд. — Википедия.
18. *Фишер Р.* Статистические методы для исследователей. — М.: Госстатиздат, 1958. — 267 с.

DEDICATED TO THE 100TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF EDMOND FISCHER, A BIOCHEMIST WHO DISCOVERED REVERSIBLE PROTEIN PHOSPHORYLATION

V.S. VOROBYEV

Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow

In connection with the 100th anniversary of the birth of the Swiss-American biochemist Edmond Henry Fischer, winner of the 1992 Nobel Prize in Physiology or Medicine, an anniversary article was prepared with an analysis of his life and work.

Keywords: history of science, biochemistry, reversible protein phosphorylation, Edmond Henry Fischer.

ПУБЛИКАЦИИ

Спирин А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка. — М.: Лаборатория знаний, 2019. — Серия «Учебник для высшей школы».

Аннотация. Учебное пособие, написанное ведущим специалистом в данной области, посвящено структурным и функциональным аспектам биосинтеза белков. Книга охватывает часть общего курса молекулярной биологии, который автор на протяжении многих лет читал на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова. Вместе с тем объем материала соответствует уровню требований кандидатского минимума по специальности «Молекулярная биология». Книга совмещает традиционное последовательное изложение и самые современные данные и не имеет аналогов в мировой литературе. Для студентов-биологов, аспирантов молекулярных биологов и биохимиков, преподавателей вузов и научных работников.

Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. Изд. 3-е, испр. — М.: Изд. группа URSS, 2020. — 328 с.

Аннотация. В справочном издании немецкого автора в наглядной форме изложены основные принципы биотехнологических методов и методов генетической инженерии. Книга построена как атлас — на каждом развороте помещены иллюстрации для презентации темы и краткий текст, где даны определения, термины и понятия. Несмотря на краткость изложения наиболее трудные вопросы раскрыты детально и четко. Имеется указатель микроорганизмов. Для студентов биологических, химико-технологических, медицинских и фармацевтических вузов.

Микробиология, вирусология, иммунология полости рта. Учебник / Под ред. В.Н. Царева. 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019.

Резюме. В учебнике изложен материал по микробиологическим аспектам отдельных направлений стоматологии: терапевтической стоматологии, пародонтологии и эндодонтии, хирургической и ортопедической стоматологии. Рассмотрены защитные физиологические механизмы и иммунные явления в полости рта, а также принципы антибактериальной и иммуномодулирующей химиотерапии. Рекомендован ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.

Сеченова» в качестве учебника для студентов учреждений высшего профессионального образования, обучающихся по специальности 60201.65 «Стоматология» по дисциплине «Микробиология и вирусология полости рта».

Колодязная В.А., Топкова О.В., Котова Н.В. Биотехнология. Учебник / Под ред. Колодяжной В.А., Самотруевой М.А. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020.

Аннотация. Учебник по биотехнологии составлен в соответствии с требованиями федерального государственного образовательного стандарта (уровень специалитета) по направлению подготовки 33.05.01 «Фармация» и рабочей программы учебной дисциплины «Биотехнология». В книге в свете современных представлений изложены основы промышленной биотехнологии, клеточной и генетической инженерии, инженерной энзимологии. Особое внимание уделено процессам получения лекарственных средств биотехнологическими методами. Подробно рассмотрены технологии производства различных классов биологически активных веществ, таких как антибиотики, терапевтические рекомбинантные белки, ферменты, витамины, гормоны и др. Издание предназначено обучающимся по специальности «Фармация», а также по направлениям и специальностям биотехнологического, биологического и медицинского образования.

Казимирченко О.В., Котлярчук М.Ю. Практикум по микробиологии. — М.: Изд-во «Лань», 2020.

Аннотация. Учебное пособие предназначено для выполнения студентами лабораторных работ, предусмотренных рабочей программой дисциплины «Микробиология» по направлению подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура». Каждая лабораторная работа включает в себя цель и задание по работе, перечень необходимых материалов и оборудования, методические указания по выполнению работы, краткий теоретический материал, формы заполнения отчета по работе, вопросы по теме для самопроверки. В практикум включен словарь терминов, поясняющий определения, используемые при изучении тем лабораторных работ.

Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и микология. 3-е изд. — М.: Изд-во «Лань», 2019. — 624 с.

Аннотация. Учебник состоит из шести разделов: «Общая микробиология», «Основы учения об инфекции», «Основы иммунологии», «Методы диагностики инфекци-

онных болезней», «Частная микробиология и микология», «Санитарная микробиология». Общая микробиология включает в себя основные сведения о морфологии, физиологии, генетике и экологии микроорганизмов, инфекции и инфекционном процессе. Иммунология посвящена видам иммунитета, неспецифическим факторам защиты, антигенам, антителам, иммунной системе организма, иммунологической толерантности и др. Частная микробиология содержит материалы о возбудителях основных инфекционных болезней их специфической профилактике, а также о патогенных микобактериях, микроскопических грибах и др. Санитарная микробиология посвящена микробиологическим исследованиям воды, почвы, воздуха, сырья животного происхождения и пищевых продуктов и кормов для животных. Учебник напечатан в соответствии с ФГОС третьего поколения, дополнен новыми теоретическими и практическими данными; предназначен для студентов, обучающихся по направлению подготовки (специальности) «Ветеринария» (квалификация (степень) «специалист»).

Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. Лабинской А.С. — М.: Изд-во «Лань», 2020.

Аннотация. В пособии освещены вопросы общей и санитарной микробиологии. Описаны требования по технике безопасности, методы дезинфекции и стерилизации,

манипуляции с экспериментальными животными. Дана информация об оснащении бактериологической лаборатории, технике выращивания и изучения микроорганизмов в живом и окрашенном состоянии, приготовлении питательных сред, изучении антибиотикоустойчивости, дифференциально-диагностическом тестировании. Включен материал по бактериофагам, генетике бактерий, идентификации микроорганизмов с помощью ПЦР, об иммунитете и методах его оценки. Особое место занимают главы о физиолого-биохимических свойствах микроорганизмов и современных технологиях, применяемых в клинической микробиологии. Рассмотрены основные задачи и методы санитарно-микробиологических исследований воды, почвы, воздуха, пищевых продуктов, перевязочных средств и т.д. Для учащихся медицинских училищ, колледжей, бакалавров, аспирантов и врачей-лаборантов.

Твердислов В.А., Сидорова А.Э. Биофизическая экология. — М.: Красанд, 2020.

Резюме. Рассматриваются современные представления о биофизических механизмах функционирования живых систем, биогеофизических и экосистем, а также биофизические аспекты эволюции биосферы. Адресовано специалистам, работающим в области биофизики, теоретической и прикладной экологии, студентам естественно-научных факультетов вузов.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 30.06.2020
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru